

## Bijsluiter voor instrumenten met MOS v4

VOOR GEBRUIK BIJ IN-VITRODIAGNOSTIEK. UITSLUITEND BEDOELD VOOR DE EXPORT.

## Beoogd gebruik

Het MiSeqDx-instrument is bedoeld voor gerichte sequencing van DNA-bibliotheken van humaan genomisch DNA dat is geëxtraheerd uit perifere volbloed of formaline-gefixeerd, paraffine-ingebed (FFPE) weefsel, wanneer het wordt gebruikt met *in-vitro* diagnostische (IVD)-assays die op het instrument worden uitgevoerd. Het MiSeqDx-instrument is niet bedoeld voor whole genome sequencing of *de novo* sequencing. Het MiSeqDx-instrument moet worden gebruikt met geregistreerde en vermelde, voor gebruik vrijgegeven of goedgekeurde IVD-reagentia en analytische software.

## Principes van de procedure

De Illumina MiSeqDx is bedoeld voor gerichte hernieuwde sequencing van menselijk DNA met behulp van Illumina-verbruiksartikelen en -bibliotheken voor sequencing die zijn bereid uit humaan genomisch DNA dat is geëxtraheerd uit perifere volbloed of FFPE-weefsel met behulp van geregistreerde en vermelde, voor gebruik vrijgegeven of goedgekeurde IVD-reagentia. Bibliotheken worden voorbereid door het amplificeren van targets en toevoegen van monsterindexen en capture-sequenties. Monsterbibliotheken worden vastgelegd op een stroomcel en gesequencet op het instrument met behulp van SBS-chemie (sequencing door synthese). SBS-chemie maakt gebruik van een omkeerbare terminatormethode om enkelvoudige nucleotidebasen te detecteren wanneer ze worden opgenomen in groeiende DNA-strengen. De Realtime analyse (RTA)-software voert beeldanalyse en basebepaling uit en kent een kwaliteitsscore toe aan elke base voor elke sequencing-cyclus. Wanneer de primaire analyse is voltooid, verwerkt de secundaire analyse op het MiSeqDx-instrument basebepalingen.

De verwerking omvat doorgaans demultiplexing, het genereren van FASTQ-bestanden, uitlijning, variantbepaling, het genereren van VCF-bestanden (Variant Call Format) die gegevens bevatten over varianten die op specifieke posities in een referentiegenoom worden gevonden. De MiSeqDx gebruikt verschillende modules voor secundaire analyse, afhankelijk van de werkstroom.

## Dual boot-configuratie

De Dual Boot-configuratie omvat de hardware-, software- en installatieprocedures waarmee het MiSeqDx-instrument zowel *in-vitro* diagnostische (IVD) als sequencing-assays alleen voor onderzoeksdoeleinden (RUO, Research Use Only) kan uitvoeren. De Dual Boot-configuratie stelt de gebruiker in staat om te schakelen tussen de diagnostische modus van het instrument en de onderzoeksmodus van het instrument. Radiofrequente identificatie (RFID) op verbruiksartikelen voor sequencing voorkomen dat RUO-sequencing-reagentia worden gebruikt in diagnostische sequencing-runs.

## Beperkingen van de procedure

- Bestemd voor *in-vitro*diagnostiek.
- De op het label gepresenteerde resultaten werden verkregen met representatieve assaypanels met behulp van perifere volbloed of cellijnen voor kiemlijnprestaties en FFPE-weefsel of FFPE-cellijnen voor somatische prestaties met de beschreven reagentia en softwaremodules. De Germline Variant- en Somatic Variant-modules zijn ontwikkeld voor het evalueren van de prestaties met representatieve assays. Prestatiekenmerken worden uitsluitend ter informatie verstrekt. De gepresenteerde validatietests dienen alleen om de algemene functies van het instrument te illustreren en stellen niet de mogelijkheden of geschiktheid van het instrument vast met betrekking tot specifieke claims. Alle diagnostische tests die voor gebruik op dit instrument zijn ontwikkeld, vereisen volledige validatie voor alle prestatieaspecten.
- Dit product is beperkt tot het leveren van het volgende:
  - Sequencinguitvoer  $\geq 5$  Gb bij een bepaling lengte van 2 x 150 bp
  - Bepalingen die door het filter komen  $\geq 15$  miljoen bij een bepaling lengte van 2 x 150 bp
  - Basen hoger dan Q30  $\geq 80\%$  bij een bepaling lengte van 2 x 150 bp  
Minstens of meer dan 80% van de basen heeft een kwaliteitsscore op de Phred-schaal groter dan 30, wat duidt op een nauwkeurigheid van de basebepaling van meer dan 99,9%.
- Het MiSeqDx-instrument is alleen gevalideerd voor het sequencen van menselijke DNA-bibliotheken die uit perifere volbloed of FFPE-weefsel zijn geëxtraheerd. Bibliotheken die zijn gegenereerd op basis van andere specimentypes mogen niet met dit instrument worden gebruikt voor *in-vitro*diagnostiek. De prestaties van dit instrument voor het sequencen van microbiële of virale nucleïnezuren uit klinische monsters zijn niet vastgesteld.
- De MiSeqDx is bedoeld voor *in-vitro*diagnostiek met geregistreerde en vermelde, voor gebruik vrijgegeven of goedgekeurde IVD-reagentia of assays. De reagensbeperkingen en prestatiekenmerken die in deze bijsluiter worden beschreven, zijn gebaseerd op representatieve assays en softwaremodules. Raadpleeg voor IVD-assays de bijsluiter van de specifieke assay voor het beoogde gebruik, de gedetecteerde varianten en het monstertype.
- Indels (inserties, deleties en combinaties daarvan) met een lengte van meer dan 25 bp worden niet uitgelijnd door de assaysoftware. Derhalve zijn indels met een lengte van meer dan 25 bp niet detecteerbaar door de assaysoftware.
- Het systeem is gevalideerd voor de detectie van enkelvoudige nucleotide varianten (SNV's, single nucleotide variants) en deleties tot 25 bp en inserties tot 24 bp bij gebruik met de softwaremodule voor kiemlijn- en somatische varianten. Bij een variantfrequentie van 0,05 werden voor somatische bepalingen deleties van 25 bp en inserties van 18 bp gedetecteerd.
- Amplicon-bepalingen met extreme variantinhoud worden mogelijk niet uitgelijnd door de assaysoftware, waardoor de regio als wild-type wordt gerapporteerd. Dergelijke extreme inhoud omvat:
  - Bepalingen die meer dan drie indels bevatten.

- Bepalingen met een lengte van ten minste 30 bp met een SNV-inhoud van meer dan 4% van de totale amplicon-targetlengte (exclusief regio's van probes).
- Bepalingen met een lengte van minder dan 30 bp met een SNV-inhoud van meer dan 10% van de totale ampliconlengte (inclusief regio's van probes).
- Grote varianten, inclusief multi-nucleotide varianten (MNV's) en grote indels worden mogelijk gerapporteerd als afzonderlijke kleine varianten in het VCF-uitvoerbestand.
- Deletievarianten kunnen worden gefilterd of gemist als deze twee amplicontegels overlappen waar de deletielengte groter is dan of gelijk is aan de overlap tussen de amplicontegels.
- Het systeem kan indels niet detecteren als deze direct aangrenzend aan een primer voorkomen en er geen overlappende amplicon is. Voor regio's met overlappende amplicons, kan de test deleties niet detecteren als de overlappingsregio kleiner is dan de afmeting van de deletie die moet worden gedetecteerd. Bijvoorbeeld: als de overlappingsregio tussen twee aangrenzende amplicons twee (2) basen betreft, kan de assay geen deleties detecteren die deze beide basen bevatten. Een deletie van een enkele base op een van deze basen kan worden gedetecteerd.
- Zoals bij elke op hybridisatie gebaseerde workflow voor bibliotheekpreparatie, kunnen onderliggende polymorfismen, mutaties, inserties of deleties in oligonucleotide-bindende regio's invloed hebben op de allelen die worden onderzocht. De sequentie-bepalingen worden daardoor ook beïnvloed. Bijvoorbeeld:
  - Een variant in fase met een variant in de primerregio kan mogelijk niet worden geamplificeerd, wat resulteert in een vals-negatief resultaat.
  - Varianten in de primerregio kunnen de amplificatie van het referentie-allel voorkomen, wat resulteert in een onjuiste homozygote variantenbepaling.
  - Indel-varianten in de primerregio veroorzaken mogelijk een vals-positieve bepaling aan het einde van de aflezing naast de primer.
- Indels worden mogelijk gefilterd vanwege vertekening van strengen als ze zich aan het einde van een aflezing voordoen en tijdens het uitlijnen zijn afgekapt.
- Kleine MNV's zijn niet gevalideerd.
- Copy number variants of structurele varianten, zoals fusies of translocaties, zijn niet gevalideerd.
- Germline-specifieke beperkingen:
  - Het MiSeqDx-systeem dat gebruikmaakt van de Germline Variant-module is ontworpen om kwalitatieve resultaten te leveren voor het bepalen van kiemlijnvarianten (d.w.z. homozygoot, heterozygoot, wild-type).
  - Bij gebruik in combinatie met de module voor kiemlijnvarianten is de minimale dekking per amplicon die nodig is voor nauwkeurige variantbepalingen 150x. Het aantal monsters en het totale aantal beoogde basen kunnen de dekking beïnvloeden. GC-inhoud en andere genomische inhoud kunnen de dekking beïnvloeden.
  - Variatie in het aantal kopieën kan van invloed zijn op het feit of een variant wordt geïdentificeerd als homozygoot of heterozygoot.

- Varianten in een bepaalde repetitieve context worden uitgefilterd in de VCF-bestanden. Het RMxN-herhalingsfilter wordt gebruikt om varianten te filteren als het geheel of een deel van de variantsequentie herhaaldelijk aanwezig is in de referentiegenoom naast de positie van de variant. Voor een bepaling van kiembaanvarianten zijn ten minste negen repeats in de referentie vereist om een variant te filteren, en alleen repeats met een lengte tot 5 bp worden in aanmerking genomen (R5x9).
- Specifieke somatische beperkingen:
  - Het MiSeqDx-instrument dat gebruikmaakt van de Somatic Variant-module is ontworpen om kwalitatieve resultaten te leveren voor somatische variantbepalingen (d.w.z. de aanwezigheid van een somatische variant met een variantfrequentie van meer dan 0,026 met een detectielimiet van 0,05).
  - Bij gebruik in met de Somatic Variant-module is de minimale dekking per amplicon die nodig is voor nauwkeurige variantbepalingen 450x per oligonucleotidepool. Het aantal monsters en het totale aantal beoogde basen kunnen de dekking beïnvloeden. GC-inhoud en andere genomische inhoud kunnen de dekking beïnvloeden.
  - Varianten in een bepaalde repetitieve context worden uitgefilterd in de VCF-bestanden. Het RMxN-repeatfilter wordt gebruikt om varianten te filteren als het geheel of een deel van de variantsequentie herhaaldelijk aanwezig is in het referentiegenoom naast de positie van de variant. Voor een bepaling van somatische varianten zijn ten minste zes repeats in de referentie vereist om de variant te filteren, en alleen repeats met een lengte tot 3 bp worden in aanmerking genomen (R3x6).
  - De Somatic Variant-module kan geen onderscheid maken tussen kiembaan- en somatische varianten. De module is ontworpen om varianten op een reeks variantfrequenties te detecteren, maar variantfrequentie kan niet worden gebruikt om somatische varianten van kiembaanvarianten te onderscheiden.
  - Normaal weefsel in het monster kan de detectie van varianten beïnvloeden. De gerapporteerde detectielimiet is gebaseerd op een variantfrequentie ten opzichte van het totale DNA dat is geëxtraheerd uit zowel tumorweefsel als normaal weefsel.

## Productonderdelen

De Illumina MiSeqDx bestaat uit het volgende:

MiSeqDx-instrument (Catalogusnr. DX-410-1001)

De volgende softwarecomponenten zijn vereist voor de bediening van het MiSeqDx-instrument en de gegevensanalyse:

Softwaretoepassing	Functie	Beschrijving
MiSeq-bedieningssoftware (MOS)	Regelt de werking van het instrument	De MOS-softwaretoepassing beheert de werking van het instrument tijdens de sequencing en genereert beelden voor gebruik door Realtime analyse (RTA)-software. Raadpleeg voor meer informatie <i>Referentiegids MiSeqDx-instrument voor MOS v4 (documentnr. 200010452)</i> .

Softwaretoepassing	Functie	Beschrijving
Realtime analyse (RTA)	Voert de primaire analyse uit	De RTA-softwaretoepassing converteert de beelden die door MOS worden gegenereerd voor elke tegel per cyclus van de sequencing-run naar basebepalingsbestanden, die de input vormen voor Local Run Manager-analysemodules. De RTA-softwaretoepassing bevat geen gebruikersinterface.
Local Run Manager	Interface voor moduleselectie	De Local Run Manager-software is een in het instrument geïntegreerde oplossing voor gebruikersbeheer, het uitvoeren van secundaire analyses en het bewaken van de status. Voor meer informatie, raadpleeg <i>Handleiding Local Run Manager v4-software voor MiSeqDx</i> (documentnr. 200046657).

## Opslag en hantering

Element	Specificatie
Temperatuur	Vervoer en opslag: -10 °C tot 40 °C (14 °F tot 104 °F) Bedieningsomstandigheden: 19 °C tot 25 °C (66 °F tot 77 °F)
Luchtvochtigheid	Vervoer en opslag: Niet-condenserende vochtigheid Bedrijfsomstandigheden: 30–75% relatieve luchtvochtigheid (niet-condenserend)

## Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

### Verbruiksartikelen voor sequencing

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Catalogusnr. 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Catalogusnr. 20063860)

### Verbruiksartikelen die door de gebruiker moeten worden geleverd

Zorg ervoor dat de volgende door de gebruiker geleverde verbruiksartikelen beschikbaar zijn voordat u met een run begint.

Verbruiksartikel	Doel
Isopropylalcoholdoekjes, 70% of Ethanol, 70%	Reiniging van het glas van de stroomcel en het werkvlak
Labdoek, niet-pluizend	Reiniging van de stroomcelhouder
Lenspapier, 4 x 6 inch.	Reiniging van de stroomcel

Verbruiksartikel	Doel
Tween 20	Wassen van het instrument
Pincet, kunststof met vierkante punt (optioneel)	Verwijderen van de stroomcel uit de transportcontainer voor de stroomcel
Water van laboratoriumkwaliteit	Wassen van het instrument

## Richtlijnen voor water van laboratoriumkwaliteit

Gebruik altijd water van laboratoriumkwaliteit of gedestilleerd water om de instrumentprocedures uit te voeren. Gebruik nooit kraanwater.

Gebruik alleen water van de volgende kwaliteit of vergelijkbaar:

- Gedestilleerd water
- Illumina PW1
- 18 Megaohm (MΩ) water
- Milli-Q-water
- Super-Q-water
- Water van moleculaire biologie-kwaliteit

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen



### WAARSCHUWING

**Deze set reagentia bevat mogelijk gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en de ogen kan persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Ventilatie moet geschikt zijn voor het hanteren van gevaarlijke materialen in reagentia. Draag beschermende hulpmiddelen, zoals oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas, die passen bij het blootstellingsrisico. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en voer deze af in overeenstemming met de geldende regionale, nationale en lokale wet- en regelgeving. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).**

- Behandel alle bloedmonsters alsof is vastgesteld dat ze besmettelijk zijn voor het humaan immunodeficiëntievirus (hiv), het humaan hepatitis B-virus (hbv) en andere door bloed overgedragen ziekteverwekkers (universele voorzorgsmaatregelen).
- Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de monsterkwaliteit aanzienlijk slechter zijn.

- Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en laboratoriumjassen bij het hanteren van monsters en reagentia. Was uw handen grondig na het hanteren van monsters en kitreagentia.
- Goede laboratoriumpraktijken en goede laboratoriumhygiëne zijn vereist om te voorkomen dat reagentia, instrumenten en genomische DNA-monsters worden verontreinigd door PCR-producten. PCR-verontreiniging kan onjuiste en onbetrouwbare resultaten veroorzaken.
- Zorg ervoor dat de pre-amplificatie- en post-amplificatiegebieden zijn voorzien van speciale apparatuur en verbruiksgoederen (bijv. pipetten, pipetpunten, verwarmingselementen, vortexers en centrifuges) om verontreiniging te voorkomen.
- Indien van toepassing moet het koppelen van indexmonsters exact overeenkomen met de afgedrukte plaatindeling. Local Run Manager vult automatisch de indexprimers in die zijn gekoppeld aan de monsternamen, wanneer deze in de module worden ingevoerd. De gebruiker wordt geadviseerd om voordat u de sequencingrun start te controleren of de indexprimers aan monsters zijn gekoppeld. Verkeerde combinaties tussen het monster en de lay-out van de plaat veroorzaakt een minder positieve monsteridentificatie en onjuiste resultaatrapportage.
- De installatie van door de gebruiker geleverde antivirussoftware wordt sterk aanbevolen om de computer tegen virussen te beschermen. Raadpleeg de gebruikershandleiding voor installatie-instructies.
- Gebruik de MiSeqDx niet als een van de panelen is verwijderd. Door het instrument te gebruiken als er panelen zijn verwijderd, ontstaat er een risico op blootstelling aan netspanning.
- Raak het plaatje van de stroomcel in het stroomcelcompartiment niet aan. De verwarming in dit compartiment werkt tussen 22 °C en 95 °C en kan brandwonden veroorzaken.
- Het instrument weegt ongeveer 57 kg (126 lbs) en kan zwaar letsel veroorzaken als het valt of verkeerd wordt behandeld.
- Meld ernstige incidenten in verband met dit product onmiddellijk aan Illumina en de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt gevestigd zijn.

## Gebruiksaanwijzing

De volgende gebruiksaanwijzing voor het MiSeqDx-instrument vereist de reagentia die worden geleverd in de MiSeqDx Reagent Kit v3.

### Run aanmaken met Local Run Manager

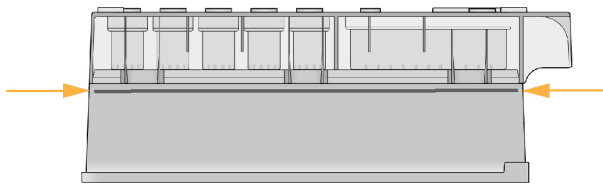
Raadpleeg voor gedetailleerde instructies voor het aanmaken van een run de *Handleiding Local Run Manager v4-software voor MiSeqDx (documentnr. 200046657)* en de Local Run Manager-modulehandleiding voor de analysemodule die u gebruikt.

## De reagenscartridge prepareren

De volgende instructies beschrijven hoe u reagentia kunt ontdooien met een waterbad op kamertemperatuur.

1. Neem de reagenscartridge uit de opslag van -15 °C tot -25 °C.
2. Plaats de reagenscartridge in een waterbad met voldoende gedeïoniseerd water op kamertemperatuur om de onderkant van de reagenscartridge onder te dompelen tot aan de waterlijn die op de reagenscartridge staat afgedrukt. Voorkom dat het water de maximale waterlijn overschrijdt.

Afbeelding 1 Maximale waterlijn



3. Laat de reagenscartridge in het waterbad op kamertemperatuur gedurende ongeveer 60–90 minuten ontdooien of totdat deze volledig is ontdooid.
4. Neem de cartridge uit het waterbad en tik er voorzichtig mee op de bank om het water uit de onderkant van de cartridge te laten lopen. Droog de onderkant van de cartridge. Controleer of er geen water op de bovenkant van de reagenscartridge is gespat.

## De reagenscartridge inspecteren

1. Keer de reagenscartridge tien keer om de ontdooide reagentia te mengen en controleer vervolgens of alle posities zijn ontdooid.
2. Inspecteer de reagentia op de posities 1, 2 en 4 om er zeker van te zijn dat deze volledig gemengd en vrij van bezinksel zijn.

**OPMERKING** Het is van cruciaal belang dat de reagentia in de cartridge grondig worden ontdooid en gemengd om een correcte sequencing te garanderen.

3. Tik voorzichtig met de cartridge op de bank om het aantal luchtbelletjes in de reagentia te verminderen.

**OPMERKING** De MiSeqDx-aanzuigbuisjes gaan naar de bodem van elk reservoir om de reagentia op te zuigen. Daarom is het belangrijk dat de reservoirs vrij zijn van luchtbelletjes.

4. Plaats de reagenscartridge op ijs of zet deze opzij bij 2 °C tot 8 °C (maximaal zes uur) totdat u klaar bent om de run in te stellen. Voor de beste resultaten gaat u direct verder met het laden van het monster en het instellen van de run.



## Monsters voorbereiden voor sequencing

Raadpleeg voor aanwijzingen over het voorbereiden van monsterbibliotheken voor sequencing, inclusief bibliotheekverduunning en pooling, het gedeelte Gebruiksaanwijzing van de bijsluiter voor bibliotheekvoorbereiding.

De verduunning van monsterbibliotheken is afhankelijk van de complexiteit van oligonucleotidepools. Optimalisatie van clusterdichtheid op de MiSeqDx is vereist. De optimale clusterdichtheid varieert afhankelijk van de specifieke bibliotheekvoorbereidingsassay.

## Monsterbibliotheken op cartridge laden

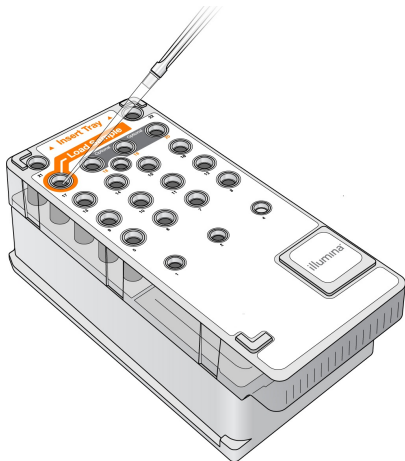
Wanneer de reagenscartridge volledig ontdooid en klaar voor gebruik is, kunt u beginnen met het laden van monsters in de cartridge.

1. Gebruik een afzonderlijke, schone en lege pipetpunt van 1 ml om de folieafdekking over het reservoir op de reagenscartridge met het label **Load Samples** te doorboren.

**OPMERKING** Doorboor geen andere reagensposities. De andere reagensposities worden tijdens de run automatisch doorboord.

2. Pipetteer 600 µl van de voorbereide DAL-monsterbibliotheken (Diluted Amplicon Library; verdunde ampliconbibliotheek) in het reservoir **Load Samples** (Monsters laden). Raak de folieafdekking niet aan.
3. Controleer reservoir na het laden van het monster op luchtbelletjes. Als er luchtbelletjes aanwezig zijn, tikt u zachtjes met de cartridge op de bank om de luchtbelletjes te verwijderen.

Afbeelding 2 Bibliotheeken laden



4. Ga direct naar de stappen voor het instellen van een run via de interface van de MiSeq-bedieningssoftware (MOS).

## Run instellen

Raadpleeg de *Referentiegeds MiSeqDx-instrument voor MOS v4 (documentnr. 200010452)* voor volledige instructies voor het instellen van de run.

1. Log in op de MiSeqDx met uw Local Run Manager-softwarewachtwoord.
2. Selecteer in het scherm Home (Start) van de MOS-software **Sequence** (Sequentie).
3. Selecteer een run in de lijst en selecteer daarna **Next** (Volgende).  
Een reeks schermen voor runinstellingen wordt in de volgende volgorde geopend: Plaats de flowcel, plaats de reagentia, en doe een beoordeling en een controle voorafgaand aan de run.
4. Wanneer het scherm Load Flow Cell (Stroomcel laden) verschijnt, reinigt u de stroomcel en laadt u deze vervolgens.
5. Sluit de stroomcelvergrendeling en de deur van het stroomcelcompartiment.  
Zowel de vergrendeling als de compartimentdeur moeten worden gesloten voordat u de run start. Nadat de stroomcel is geladen, leest en registreert de software de RFID. In de rechterbenedenhoek van het scherm ziet u een bevestiging dat het lezen van de RFID is geslaagd.
6. Volg de softwareprompts om de fles met MiSeqDx SBS-oplossing (PR2) te laden, zorg ervoor dat de afvalfles leeg is en laad de reagenscartridge.  
Nadat de fles met MiSeqDx SBS-oplossing (PR2) en de reagenscartridge zijn geladen, leest en registreert de software de RFID. In de rechterbenedenhoek van het scherm ziet u een bevestiging dat het lezen van de RFID is geslaagd.
7. Het scherm Sequencing wordt geopend wanneer de run begint. Dit scherm biedt een visuele weergave van de actieve run, inclusief intensiteiten en kwaliteitsscores (Q-scores).

## Resultaten

Realtime analyse (RTA) is geïntegreerde software die beeldanalyse en basebepaling uitvoert en aan elke base een kwaliteitsscore toekent voor elke sequencing-cyclus. Wanneer de primaire analyse is voltooid, begint de module op het MiSeqDx-instrument die is geselecteerd in [Run aanmaken met Local Run Manager op pagina 7](#) met de secundaire analyse. Raadpleeg de documentatie van de specifieke assay voor andere workflows.

## Kwaliteitscontroleprocedures

De MiSeqDx-software evalueert elke run, elk monster en elke basebepaling aan de hand van kwaliteitscontrolestatistieken. Indien vereist, moeten de positieve en negatieve controles die onderdeel uitmaken van de bibliotheekvoorbereiding ook worden geëvalueerd met betrekking tot de verwachte resultaten.

# Prestatiekenmerken

Alle onderzoeken werden uitgevoerd op de MiSeqDx.

In kiemlijnonderzoeken werden de reagentia van ofwel de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay ofwel de TruSeq aangepaste ampliconkit Dx gebruikt voor de bibliotheekvoorbereiding. De twee kits gebruiken identieke reagentia voor bibliotheekvoorbereiding en hun workflows wijken slechts op één punt van elkaar af: het aantal polymerasekettingreactie (PCR)-cycli (respectievelijk 25 en 28). De extra PCR-cycli zorgen voor een lagere DNA-invoer met de TruSeq aangepaste ampliconkit Dx (50 ng) in vergelijking met de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay (250 ng), zoals aangetoond in het onderzoek naar DNA-input met de TruSeq aangepaste ampliconkit Dx. Bibliotheken voorbereid met de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay, werden gesequenced met de bijbehorende sequencing-reagentia in de kit. Bibliotheken voorbereid met de TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, werden gesequenced met MiSeqDx Reagent Kit v3. De laatstgenoemde sequencing-reagentia hebben een hogere output dan die in de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay.

De testen worden uitgevoerd op de monsterdoorvoercapaciteit die wordt ondersteund door de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. De MiSeqDx kan 1-96 monsters/run ondersteunen, afhankelijk van de assay. De MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro is ontworpen om voor bepaalde assays lagere monsterdoorvoer te ondersteunen binnen dit bereik.

Voor somatische onderzoeken werd de TruSeq Custom Amplicon Kit Dx met de MiSeqDx Reagent Kit v3 gebruikt.

De kiemlijnworkflow of de somatische workflow, beschreven voor de TruSeq aangepaste ampliconkit Dx om bibliotheken voor te bereiden op sequencing, werd gevolgd door analyse met respectievelijk de Germline Variant-module of Somatic Variant-module, met twee uitzonderingen. Onderzoeken waarbij het ene gen (kiemlijnprestaties; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay) of twee genen (somatische prestaties) als representatieve mutatiepanels werden gebruikt, maakten gebruik van assayspecifieke workflows en analysemodules.

**OPMERKING** De genomische inhoud van amplicons wordt samengevat ten opzichte van de gesequencede genomische streng. Voor amplicons die zijn ontworpen tegen de min-streng, is de inhoud van het referentiegenoom de omgekeerde aanvulling (PolyA-regio's op min-streng-amplicons komen bijvoorbeeld overeen met PolyT-regio's op het referentiegenoom).

## Definities van berekeningen die worden gebruikt in prestatiekenmerken

- Positieve Procentuele Overeenkomst (PPA) wordt berekend als het aandeel loci dat door een referentiemethode als varianten wordt geclassificeerd en correct door de assay wordt gerapporteerd.
  - $$\frac{\text{(aantal variant-loci correct gerapporteerd door de assay)}}{\text{(totaal aantal variant-loci)}}$$
 Variantloci gerapporteerd door de assay die overeenkomen met de referentiemethode zijn terecht-

positieven (TP's). Variant-loci die door de assay als referentiebepalingen of als verschillende variantbepalingen worden gerapporteerd, zijn vals-negatieven (FN's)

- Negatieve Procentuele Overeenkomst (NPA) wordt berekend als het deel van de loci die door een referentiemethode als wild-type zijn geclassificeerd en die door de assay correct worden gerapporteerd.
  - $(\text{aantal wild-type loci correct gerapporteerd door de assay}) / (\text{totaal aantal wild-type loci})$   
Door de assay gerapporteerde wild-type loci die overeenkomen met de referentiemethode zijn terecht-negatieven (TN's). Wild-type loci die door de assay als varianten worden gerapporteerd, zijn fout-positieven (FP's).
- Algehele procentuele overeenkomst (OPA) wordt berekend als het aandeel van loci dat correct door de assay wordt gerapporteerd ten opzichte van een referentiemethode.
  - $((\text{aantal variant loci correct gerapporteerd door de assay}) + (\text{aantal wild-type loci correct gerapporteerd door de assay})) / ((\text{totaal aantal variant loci}) + (\text{totaal aantal wild type loci}))$
- De berekeningen van PPA, NPA en OPA houden geen rekening met niet-bepalingen (variant- of referentieloci die niet voldoen aan een of meer kwaliteitsfilters) bij variantbepalende toepassingen. Twee onderzoeken bevatten specifiek niet-bepalingen in hun statistiek '% correcte bepalingen', en deze inclusie van niet-bepalingen wordt vermeld voor de toepasselijke tabellen.
- Het bepalingpercentage wordt berekend als het totale aantal loci die door filters worden doorgelaten, gedeeld door het totale aantal posities die zijn gesequenced voor chromosomen 1-22. Chromosomen X en Y zijn uitgesloten. Deze metriek houdt geen rekening met de overeenkomst van de bepalingen met de referentiemethode.

Voor de prestatiekenmerken met betrekking tot pre-analytische factoren (bijv. extractiemethoden of DNA-input) raadpleegt u de bijsluiter voor de toepasselijke bibliotheekvoorbereidingsmethode.

## Monsterindexering

Monsterindexprimers, die worden toegevoegd tijdens de bibliotheekvoorbereiding, wijzen een unieke sequentie toe aan elk monster-DNA, waardoor meerdere monsters kunnen worden samengevoegd tot een enkele sequencing-run. Monsterindexering is getest voor kiemlijn- en somatische workflows.

In totaal werden er 96 monsterindexen getest tijdens een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken die 12.588 basen per streng bestrijken voor alle 23 menselijke chromosomen. Het doel was te verifiëren in hoeverre de assay in staat was om op consistente wijze een genotyperingsbepaling te verrichten voor een bepaald monster over verschillende combinaties van indexeringsprimers. Het Y-chromosoom bevat geen zekere regio's en werd niet geëvalueerd. Er werden acht unieke monsters getest met 12 verschillende combinaties van indexeringsprimers per monster. De monsterresultaten van de kiemlijnanalysemodule werden vergeleken met Platinum Genomes versie 2016-01. De PPA (SNV's en indels) overschreedt de 97% (van de terecht positieve bepalingen waren er ten minste 70 voor SNV's, 38 voor inserties, 36 voor deleties) en de NPA was 100% (ten minste 23.440 referentieposities per indexcombinatie) voor elk van de 96 indexcombinaties. Onafhankelijk hiervan werd een enkele index getest om te controleren of de sequencingchemie van de MiSeqDx Reagent Kit v3 minder dan acht monsters kan

ondersteunen (de eerdere chemie in de MiSeqDx universele kit 1.0 was beperkt tot minimaal acht monsters). De enkele index had PPA-waarden van 98,9% (180/182) voor SNV's, 100% (38/38) voor inserties en 100% (46/46) voor deleties. De NPA was 100% (23.856/23.856).

Er werden twaalf replicaten (24 bibliotheken) van een monster getest om de indexnauwkeurigheid te meten met somatische varianten bij frequenties van 0,05–0,10 met behulp van de somatische variantmodule (er werden twee indexcombinaties per replicaat gebruikt om somatische bepalingen uit te voeren). De PPA was 100% voor SNV's (64/64), inserties (11/11) en deleties (19/19). De NPA was 100% (minstens 11.590 referentieposities per indexcombinatie) voor alle indexcombinaties.

## Overdracht van monsters

De workflow van het MiSeqDx-instrument omvat bibliotheekvoorbereiding en sequencing van meerdere monsters plus controles die allemaal tegelijk worden verwerkt. Het monsteroverdrachtonderzoek werd uitgevoerd om te evalueren of fout-positieve resultaten, als gevolg van overdracht tussen de putjes tijdens de voorbereiding van de monsterbibliotheek en run-tot-run-contaminatie tussen opeenvolgende sequencing-runs, negatieve gevolgen voor de testresultaten hebben. Er werden somatische varianten gebruikt, omdat deze kunnen worden gedetecteerd bij gebeurtenissen met een lagere allelfrequentie dan kiemlijnvarianten.

De monsters bestonden uit vier genomische DNA-monsters van cellijnen, die elk verschillende panelmutaties bevatten in een representatieve assay met twee genen. De monsters waren zodanig dat een mutatie op een positie in de ene een referentiesequentie (wild-type) in de andere zal hebben.

Overdracht tussen putjes wordt gedefinieerd als een foutmodus die mogelijk ontstaat door handmatige verwerkingsstappen (pipetteren, verwisseling van monsters, etcetera). Om overdracht van het ene monsterputje naar het andere te evalueren, werden er twee testruns uitgevoerd:

- Een dambordpatroon van een genomisch DNA-monster met hoge input (gDNA) dat een mutatie in Gen 1 bevat, afgewisseld met een monster van gDNA met lage input dat een mutatie in Gen 2 bevat.
- Een dambordpatroon van een gDNA-monster met hoge input dat een mutatie in Gen 2 bevat, afgewisseld met een monster van gDNA met lage input dat een mutatie in Gen 1 bevat.

Tijdens elke run werden in totaal 12 replicaten geëvalueerd op fout-positieven (bijv. een Gen 1-mutatie gerapporteerd in een putje dat is aangeduid als een Gen 2-mutantmonster of vice versa).

Overdracht tussen runs wordt gedefinieerd als een foutmodus die kan ontstaan door residu van een eerdere sequencing-run. Om te bepalen of er sprake is van overdracht tussen sequencing-runs, werden twee platen met elk 11 replicaten van een enkel uniek monster van gDNA met hoge input plus een blanco monster achtereenvolgens geprepareerd en gesequenced op één MiSeqDx-instrument en op fout-positieven geëvalueerd. De eerste run bevatte 11 replicaten van een Gen 2-mutantmonster plus 1 blanco monster. De tweede run bevatte 11 replicaten van een Gen 1-mutantmonster plus 1 blanco monster. De Gen 2-mutantmonsterbibliotheek werd eerst gesequenced, gevolgd door een daaropvolgende sequencing-run met de Gen 1-mutantmonsterbibliotheek, gevolgd door een tweede sequencing-run van de Gen 2-mutantmonsterbibliotheek. Als er Gen 2-mutaties werden waargenomen in een run met alleen een Gen 1-mutant, en vice versa, zou dit op overdracht duiden.

Er werden nul fout-positieven (0/24, 0%) als gevolg van overdracht tussen *putjes* gerapporteerd. Alle verwachte mutaties werden gedetecteerd. Er werden nul fout-positieven (0/24, 0%) als gevolg van overdracht tussen *runs* gerapporteerd. Alle verwachte mutaties werden gedetecteerd. Er werden nul fout-positieven (0/48, 0%) als gevolg van *totale* overdracht (tussen *putjes* en tussen *runs* gecombineerd) gerapporteerd.

## Prestatiekenmerken (kiemlijn)

Voor de hier beschreven onderzoeken werd de module voor kiemlijnvarianten gebruikt om sequencing-gegevens te analyseren, behalve die onderzoeken die gebruik maakten van het 1-genpanel waarvoor een assayspecifieke module werd gebruikt.

### Nauwkeurigheid

Het volgende onderzoek werd uitgevoerd om de nauwkeurigheid van het MiSeqDx-instrument te beoordelen met de MiSeqDx Reagent Kit v3 en hoogwaardig DNA. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 12.588 basen in 23 verschillende chromosomen, gebruik makend van 150 amplicons. Het Y-chromosoom bevat geen zekere regio's en werd niet geëvalueerd. De 12 unieke monsters die in dit onderzoek werden gebruikt, waren afkomstig uit dezelfde familie (twee ouders en tien kinderen) en werden vaak gesequenced door meerdere laboratoria en sequencing-methodologieën. Er zijn vijf monsters van vrouwen en zeven van mannen. Elk van de monsters werd in tweevoud getest. De nauwkeurigheid werd bepaald voor SNV's, inserties en deleties door de onderzoeksgegevens te vergelijken met een goed gekarakteriseerde referentiedatabase. De sequentie van de referentiedatabase (Platinum Genomes versie 2016-01) werd afgeleid van de combinatie van meerdere sequencing-methodologieën, openbaar beschikbare gegevens en erfelijke informatie. Zekere genomische regio's werden gedefinieerd op basis van deze referentiemethode, tenzij anders aangegeven. In totaal werden met de monsters acht runs uitgevoerd. De tabellen die worden gepresenteerd om de nauwkeurigheid aan te tonen, zijn gebaseerd op gegevens van de eerste run.

**Tabel 1** bevat de onderzoeksgegevens gepresenteerd met positieve en negatieve procentuele overeenkomst per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met de goed gekarakteriseerde samengestelde referentiemethode voor PPA-berekeningen. De drie varianttypen (SNV's, inserties en deleties) worden gecombineerd. Omdat de referentiemethode alleen resultaten oplevert voor de enkelvoudige nucleotide-varianten en inserties/deleties, worden niet-variantebaseresultaten vergeleken met build hg19 van de referentiesequentie van het menselijk genoom voor NPA-berekeningen.

Tabel 1 Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument per monster

Monster	Gemiddeld bepalingpercentage	Totaal aantal varianten	Totaal aantal TP-varianten	Totaal aantal FN-varianten	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal TN-bepalingen	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	>99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100
NA12879	>99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	>99,9
NA12880	>99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	>99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	>99,9
NA12882	>99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	>99,9
NA12883	>99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	>99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	>99,9
NA12885	>99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	>99,9
NA12886	>99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	>99,9
NA12888	>99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	>99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

De representatieve assay bestond uit 150 amplicons die tot doel hadden om een verscheidenheid aan genomische inhoud te dekken. De GC-inhoud van de amplicons varieerde van 26% tot 87%. Amplicons hadden ook een reeks van enkele nucleotide- (bijv. PolyA, PolyT), dinucleotide- en trinucleotideherhalingen. De gegevens werden verzameld per amplicon (Tabel 2) om het effect van genomische inhoud op het percentage correcte bepalingen vast te stellen. Het percentage correcte bepalingen bestaat uit variant- en referentiebepalingen en is minder dan 100% als er ofwel onjuiste ofwel geen bepalingen zijn. Er vinden geen bepalingen plaats als niet wordt voldaan aan een of meer filters voor variantbepaling (bijvoorbeeld onvoldoende dekking).

Van de acht FN-varianten uit Tabel 2 kwamen er zeven voor met een insertie van 1 bp op amplicon 111 dat ook PolyA-homopolymeer en een GC-inhoud van 0,29 bevat. De resterende 1 FN (onjuiste bepaling) was het gevolg van een verwachte heterozygote SNV (enkelvoudige nucleotide-variant), op amplicon 125 met een GC-inhoud van 0,68, bepaald als een homozygote variant. De frequentie van de SNV-variant was 0,71, wat boven de 0,70-drempel ligt voor classificatie als homozygote variant. Het amplicon met het laagste percentage correcte bepalingen (98,2%) was amplicon 17 met 40 niet-bepalingen en met AT-repeats en GC-inhoud van 27%.



Tabel 2 Nauwkeurigheid op amplicon-niveau voor het MiSeqDx-instrument

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N.v.t.	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N.v.t.	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N.v.t.	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N.v.t.	0,29	1872	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N.v.t.	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N.v.t.	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N.v.t.	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N.v.t.	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N.v.t.	0,42	1992	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N.v.t.	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N.v.t.	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N.v.t.	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N.v.t.	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N.v.t.	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N.v.t.	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N.v.t.	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N.v.t.	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N.v.t.	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N.v.t.	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N.v.t.	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N.v.t.	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N.v.t.	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N.v.t.	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N.v.t.	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N.v.t.	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	N.v.t.	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N.v.t.	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N.v.t.	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N.v.t.	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N.v.t.	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N.v.t.	0,55	0	0	0	N.v.t.
149	Y	2655519	2655609	91	0	N.v.t.	0,48	0	0	0	N.v.t.
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	N.v.t.

Varianten die niet-bepalingen waren, zijn samengevat in [Tabel 3](#). De specifieke filters die tot niet-bepalingen hebben geleid, worden vermeld in de tabel. De insertie op amplicon 111 werd gefilterd voor negen van de 16 voorvallen, waarbij de overige zeven voorvallen als referentie werden bepaald en daarom FN's zijn.

Tabel 3 Samenvatting van varianten niet-bepalingen

Amplicon nr.	Chr:Pos	Variant	Overeenkomstige amplicon-inhoud	Filter	Gemiste varianten	Verwachte varianten	FN-bepalingen
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42% GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Herhaal het filter. Een variant wordt gefilterd als de variant geheel of gedeeltelijk herhaaldelijk aanwezig is in het referentiegenoom naast de variantpositie. Er zijn ten minste negen repeats in de referentie vereist en alleen repeats met een lengte tot 5 bp worden in aanmerking genomen.

De sequencingresultaten voor monster NA12878 werden vergeleken met een genotype met hoge betrouwbaarheid voor NA12878, vastgesteld door de National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Van de 150 amplicons waren 92 amplicons volledig aanwezig in de uiterst zekere genomische regio's, hadden 41 amplicons een gedeeltelijke overlap en hadden 17 amplicons geen overlap in de NIST-sequentie. Dit resulteerde in 10.000 coördinaten per replicaat ter vergelijking. Niet-variante basebepalingen werden vergeleken met build 19 van het humane referentiegenoom. De nauwkeurighedsresultaten worden weergegeven in [Tabel 4](#).

Tabel 4 Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument voor NA12878-monster met de NIST-database

Monster	Aantal amplicons	Gemiddeld bepalingpercentage	Totaal aantal TP-varianten	Totaal aantal FN-varianten	Totaal aantal TN-bepalingen	Totaal aantal FP-bepalingen	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

De monsters werden verder geanalyseerd op het bepalen van kleine inserties en deleties (indels) ([Tabel 5](#)). In sommige gevallen was de indel gebruikelijk bij twee of meer monsters, zoals weergegeven in de kolom Totaal aantal monsterreplicaten met Indel. De resultaten voor beide replicaten van de 12 geldige monsters zijn opgenomen in [Tabel 5](#). Er waren in totaal 71 indels, variërend in grootte van 1–24 bp voor inserties en 1–25 bp voor deleties. Hiervan werden 69 indels elk gedetecteerd met een positieve procentuele overeenkomst van 100%. Eén deletie (amplicon 64; 2-bpdeletie (chr10 55892600 TAC>T) had geen juiste bepalingen omdat elk van deze varianten een niet-bepaling was vanwege het R5x9-filter. Daarom kon PPA, dat geen bepalingen uitsluit, niet worden berekend. Een andere indel, 1-bpinsertie (chr17 39589692 C>CA op amplicon 111), had ook geen juiste bepalingen omdat negen varianten een niet-bepaling waren vanwege het R5x9-filter en zeven FN-bepalingen waren.

Tabel 5 Samenvatting van Indel-detectie met het MiSeqDx-instrument

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
1	1	36450544	93	25 bp deletie	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp deletie	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp insertie	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp deletie	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp insertie	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp insertie	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp insertie	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
9	2	87003972	80	6 bp deletie	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp insertie	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp insertie	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp insertie	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp deletie	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp insertie	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp deletie	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp deletie	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp insertie	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp deletie	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp insertie	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp deletie	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp deletie	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp deletie	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp deletie	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp insertie	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp deletie	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp insertie	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp deletie	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp deletie	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp deletie	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp insertie	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp insertie	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp deletie	TCTGGGGGGCAGCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp deletie	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp deletie	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp deletie	TAC>T	10	10	0	0	N.v.t.
68	11	30177690	70	2 bp insertie	C>CTG	10	0	0	10	100



Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
70	11	59837721	62	8 bp insertie	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp deletie	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp deletie	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp insertie	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp insertie	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp insertie	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp deletie	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp deletie	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp insertie	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp deletie	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp deletie	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp deletie	CAAAAT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp deletie	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp insertie	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp insertie	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp deletie	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp deletie	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp insertie	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp insertie	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp insertie	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp insertie	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp deletie	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp deletie	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp insertie	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp insertie	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp deletie	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp deletie	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp insertie	A>AGTGGG	20	0	0	20	100

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
132	20	50897361	67	11 bp insertie	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp deletie	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp insertie	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp deletie	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp deletie	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp insertie	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp insertie	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp deletie	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Reproduceerbaarheid

Er zijn twee onderzoeken uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van het MiSeqDx-instrument te beoordelen met cellijnen (onderzoek 1 en 2) of met leukocyt-verarmd bloed verrijkt met cellijnen (onderzoek 2). Voor onderzoek 1 werden meerdere instrumenten gebruikt. Voor onderzoek 2 werden meerdere locaties gebruikt.

### Onderzoek 1

De reproduceerbaarheid van het MiSeqDx-instrument werd bepaald met behulp van twee instrumenten, twee operators en twee reagenspartijen voor in totaal acht runs. De representatieve assay, monsters en referentiemethode zijn dezelfde als beschreven voor het nauwkeurigheidsonderzoek.

De resultaten worden voor elk instrument gepresenteerd per amplicon ([Tabel 6](#)) om de reproduceerbaarheid van bepalingen tussen instrumenten aan te tonen. Het percentage correcte bepalingen omvatte zowel onjuiste als niet-bepalingen (aan een of meer filters wordt niet voldaan voor variantbepalingen). De instrumenten genereerden vergelijkbare aantallen niet-bepalingen en onjuiste bepalingen, afhankelijk van het specifieke amplicon.

Tabel 6 Resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek tussen instrumenten voor het MiSeqDx-instrument (amplicon-niveau)

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	N.v.t.	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	N.v.t.	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	N.v.t.	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	N.v.t.	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	N.v.t.	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	N.v.t.	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	N.v.t.	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	N.v.t.	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	N.v.t.	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	N.v.t.	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	N.v.t.	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	N.v.t.	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	N.v.t.	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	N.v.t.	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	N.v.t.	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	N.v.t.	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
80	12	30881766	30881846	81	81	N.v.t.	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	N.v.t.	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	N.v.t.	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	N.v.t.	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	N.v.t.	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	N.v.t.	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0



Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
123	18	59773996	59774060	65	65	N.v.t.	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	N.v.t.	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	N.v.t.	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	N.v.t.	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	N.v.t.	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	N.v.t.	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	N.v.t.	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
147	X	135290777	135290847	71	71	N.v.t.	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	N.v.t.	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	N.v.t.	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

De resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek werden per operator geanalyseerd met behulp van variantfrequentie (Tabel 7). Deze analyse toonde aan dat de variantfrequenties consistent waren bij alle operators. Gemiddelde variantfrequenties +/- 1 standaarddeviatie worden gepresenteerd.

Tabel 7 Resultaten tussen operatoren voor het MiSeqDx-instrument

Variantfrequentiebereik	Aantal unieke varianten	Totaal aantal varianten geanalyseerd operator 1	Totaal aantal varianten geanalyseerd operator 2	Gemiddelde (SD) gerapporteerde variantfrequentie operator 1	Gemiddelde (SD) gerapporteerde variantfrequentie operator 2
Homozygoot (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozygoot (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

De resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek voor elk monster zijn samengesteld uit alle acht runs (Tabel 8). De detectie wordt voor elk varianttype (SNV's, inserties en deleties) afzonderlijk geëvalueerd. Referentieposities zijn uitgesloten. Deze analyse toonde aan dat de resultaten voor de varianten reproduceerbaar waren in de monsters.

Tabel 8 Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument per monster

Monster	SNV's				Inserties			Deleties				
	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0

Monster	SNV's			Inserties			Deleties					
	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

De gegevens van de acht runs in dit reproduceerbaarheidsonderzoek ondersteunen de claim dat het MiSeqDx-instrument consistent kan sequensen:

- GC-inhoud  $\geq 19\%$  (alle bepaalde basen in 192 van de 192 gesequenced amplicons met 19% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 1,1%)
- GC-inhoud  $\leq 78\%$  (alle bepaalde basen in 192 van de 192 gesequenced amplicons met 78% GC-inhoud correct bepaald met een nul niet-bepalingen)
- PolyA-lengtes  $\leq 8$  (PolyA-repeat van 8 nucleotiden werd correct bepaald in 192 van de 192 gesequencede amplicons met PolyA = 8)
- PolyT-lengtes  $\leq 10$  (PolyT-repeat van 10 nucleotiden werd correct bepaald in 192 van de 192 gesequencede amplicons met PolyT = 10)
- PolyG-lengtes  $\leq 7$  (PolyG-repeat van 7 nucleotiden werd correct bepaald in 192 van de 192 gesequencede amplicons met PolyA = 7)
- PolyC-lengtes  $\leq 6$  (PolyC-repeat van 6 nucleotiden werd correct bepaald in 576 van de 576 gesequenced amplicons met PolyC = 6)
- Dinucleotide-repeatlengtes  $\leq 11x$  (alle bepaalde basen in 192 van de 192 gesequencede amplicons met 11x dinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,5%)
- Trinucleotide-repeatlengtes  $\leq 5x$  (alle bepaalde basen in 192 van de 192 gesequencede amplicons met 5x trinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,5%)
- 24 of minder base-inserties en 25 of minder base-deleties
  - 24-base-inserties correct bepaald in 192 van de 192 monsters

- 25 base-deleties werden correct bepaald in 223 monsters en gerapporteerd als onjuiste bepaling in 1 van de 224 monsters

## Onderzoek 2

Een reproduceerbaarheidsonderzoek van locatie tot locatie uitgevoerd met een representatieve assay, de Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay, omvatte een subset van klinisch significante genetische variaties van *CFTR*, geanalyseerd met de MiSeq Reporter-software met behulp van de MiSeqDx-gerichte DNA-sequencing-workflow. Voor het geblindeerde onderzoek werden 3 proeflocaties met 2 operators op elke locatie gebruikt. Twee goed gekarakteriseerde panels van elk 46 monsters werden door elk van de operators op elke locatie getest voor een totaal van 810 bepalingen per locatie. De panels bevatten een mix van genomisch DNA van cellijnen met bekende varianten in het *CFTR*-gen, evenals leukocyt-verarmd bloed verrijkt met cellijnen met bekende varianten in het *CFTR*-gen. De bloedmonsters werden verstrekt om opname van de extractiestappen mogelijk te maken die worden gebruikt om gDNA voor te bereiden dat dient als de primaire input voor de assayworkflow. Het slagingspercentage van monsters, gedefinieerd als het aantal monsters dat bij de eerste poging aan de metrische QC-vereisten voldoet, was 99,88%. Alle testresultaten zijn gebaseerd op initiële testen.

Tabel 9 Samenvatting van de resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd met een representatieve MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-variant assay

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
					1	2	3	1	2	3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie					
					1	2	3	1	2	3					
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C niet aanwezig	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie					
					1	2	3	1	2	3					
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.v.t.	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.v.t.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	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

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
					B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12					
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	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.v.t.	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.v.t.	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.v.t.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	100	100

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie	Locatie					
					1	2	3	1	2	3					
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.v.t.	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
Totaal				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88



<sup>1</sup> De wild-type-locatie die overeenkomt met de N1303K-variant voor één replicaat resulteerde in een niet-bepaling vanwege onvoldoende dekking.

<sup>2</sup> Eén replicaat van monsters 5 en 75 had een bepalingspercentage van 0%. Nader onderzoek wijst uit dat er mogelijk geen monsters aan de monsterplaat waren toegevoegd voorafgaand aan de bibliotheekvoorbereiding, omdat de monstervolumes die in de buisjes achterbleven consistent waren met het feit dat er geen volume was verwijderd.

<sup>3</sup> Er zijn aanwijzingen dat monsters 9 en 10 waarschijnlijk door de operator werden verwisseld voorafgaand aan de bibliotheekvoorbereiding.

<sup>4</sup> De wild-type-locatie die overeenkomt met de M1V-variant voor één replicaat van elk van de twee monsters resulteerde in een niet-bepaling vanwege onvoldoende dekking.

## Somatische prestatiekenmerken

Voor de hier beschreven onderzoeken werd de module voor somatische varianten gebruikt om sequencing-gegevens te analyseren, behalve die onderzoeken die gebruik maakten van het 2-genpanel waarvoor een assayspecifieke module werd gebruikt.

### Nauwkeurigheid

Er zijn drie onderzoeken uitgevoerd om de nauwkeurigheid van het MiSeqDx-instrument te beoordelen met het DNA te dat uit FFPE-monsters is geëxtraheerd.

### Onderzoek 1

Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 12.588 basen in 23 verschillende chromosomen, gebruik makend van 150 amplicons. Het Y-chromosoom bevat geen zekere regio's en werd niet geëvalueerd. De vijf unieke monsters die in dit onderzoek werden gebruikt, waren afkomstig uit dezelfde familie (twee ouders en drie kinderen) en werden vaak gesequenced door meerdere laboratoria en sequencing-methodologieën. Er zijn drie monsters van vrouwen en twee van mannen. Alle monsters werden in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed voordat het DNA voor het onderzoek werd geëxtraheerd. Monster GM12877 werd op DNA-niveau verdund met monster GM12878 om GM12877-D te creëren, teneinde een reeks varianten te maken met frequenties in de buurt van 5% en 10%. Elk van de monsters werd in tweevoud getest, behalve GM12877-D, dat met vijf replicaten werd getest. De nauwkeurigheid werd bepaald voor SNV's, inserties en deleties door de onderzoeksgegevens te vergelijken met een goed gekarakteriseerde referentiedatabase. De sequentie van de referentiedatabase (Platinum Genomes versie 2016-01) werd afgeleid van de combinatie van meerdere sequencing-methodologieën, openbaar beschikbare gegevens en erfelijke informatie. Zekere genomische regio's werden gedefinieerd op basis van deze referentiemethode, tenzij anders aangegeven. In totaal werden met de monsters acht runs uitgevoerd. De tabellen die worden gepresenteerd om de nauwkeurigheid aan te tonen, zijn gebaseerd op gegevens van de eerste run.

**Tabel 10** bevat de onderzoeksgegevens gepresenteerd met positieve en negatieve procentuele overeenkomst per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met de goed gekarakteriseerde samengestelde referentiemethode voor PPA-berekeningen. De drie varianttypen (SNV's, inserties en deleties) worden gecombineerd. Omdat de referentiemethode alleen resultaten oplevert voor de enkelvoudige nucleotide-varianten en inserties/deleties, worden niet-variantebaseresultaten vergeleken met build hg19 van de referentiesequentie van het menselijk genoom voor NPA-berekeningen.

**Tabel 10** Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument met referentiegegevens voor zes goed gekarakteriseerde monsters

Monster	Gemiddeld bepalingpercentage	Totaal aantal varianten	Totaal aantal TP-varianten	Totaal aantal FN-varianten	Totaal aantal TN-bepalingen	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

<sup>1</sup> Varianten met een frequentie van meer dan 20%.

<sup>2</sup> Variant met een frequentie van minder dan 20%.

De 150 amplicons hebben als doel een verscheidenheid aan genomische inhoud te dekken. De GC-inhoud van de amplicons varieerde van 26% tot 87%. Amplicons hadden ook een reeks van enkele nucleotide (bijv. PolyA, PolyT), dinucleotide en trinucleotide repeats. Er werden zes unieke monsters gebruikt in de assay. De gegevens werden verzameld per amplicon (**Tabel 11**) om het effect van genomische inhoud op het percentage correcte bepalingen vast te stellen. Het percentage correcte bepalingen bestaat uit variant- en referentie-bepalingen en is minder dan 100% als er ofwel onjuiste ofwel geen bepalingen zijn. Er vinden geen bepalingen plaats als niet wordt voldaan aan een of meer filters voor variantbepaling (bijvoorbeeld onvoldoende dekking). Er waren geen onjuiste bepalingen. Het aantal niet-bepalingen varieerde aanzienlijk tussen de amplicons. GC-inhoud en verschillende interacties met GC-inhoud waren de belangrijkste voorspellers van niet-bepalingen. Van alle niet-bepalingen waren 2040/2580 (79%) te wijten aan het niet voldoen aan de dekkingspecificatie. Amplicons met een GC-inhoud van meer dan 78% resulteerden in de meeste niet-bepalingen. Een representatief amplicon met 78% GC-inhoud had in totaal 675 niet-bepalingen. Een representatief amplicon met 87% had in totaal 1365 niet-bepalingen. De dekking kan worden vergroot door het aantal monsters dat op de stroomcel wordt geladen te verminderen, wat detectie op amplicons met een hoge GC-inhoud mogelijk maakt.

Tabel 11 Nauwkeurighedsgegevens op ampliconniveau

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N.v.t.	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	N.v.t.	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	N.v.t.	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N.v.t.	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	N.v.t.	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N.v.t.	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N.v.t.	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N.v.t.	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N.v.t.	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	N.v.t.	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	N.v.t.	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N.v.t.	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N.v.t.	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N.v.t.	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N.v.t.	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N.v.t.	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N.v.t.	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	N.v.t.	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N.v.t.	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N.v.t.	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N.v.t.	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N.v.t.	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N.v.t.	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N.v.t.	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	N.v.t.	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N.v.t.	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N.v.t.	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100

Amplicon	Chromosoom	Amplicon start	Amplicon einde	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	% correcte bepalingen
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	N.v.t.	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N.v.t.	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N.v.t.	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N.v.t.	0,55	0	0	0	N.v.t.
149	Y	2655519	2655609	91	0	N.v.t.	0,48	0	0	0	N.v.t.
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	N.v.t.

Varianten die niet-bepalingen waren, zijn samengevat in [Tabel 12](#). De specifieke filters die tot niet-bepalingen hebben geleid, worden vermeld in de tabel.

Tabel 12 Samenvatting van varianten niet-bepalingen

Amplicon nr.	Chr.Pos	Variant	Overeenkomstige amplicon-inhoud	Filter	Gemiste varianten	Verwachte varianten
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP <sup>1</sup>	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC (4), 61% GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87% GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LaagDP: Lage dekking. Een variant wordt gefilterd als de diepte in ten minste één van de pools op deze specifieke positie lager is dan 900.

<sup>2</sup> R3x6: Herhaal het filter. Een variant wordt gefilterd als de variant geheel of gedeeltelijk herhaaldelijk aanwezig is in het referentiegenoom naast de variantpositie. Er zijn ten minste zes repeats in de referentie vereist en alleen repeats met een lengte tot 3 bp worden in aanmerking genomen.



De sequencing-resultaten voor monster NA12878 werden vergeleken met een zeer zeker genotype voor NA12878, vastgesteld door de National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Van de 150 amplicons waren 92 amplicons volledig aanwezig in de uiterst zekere genomische regio's, hadden 41 amplicons een gedeeltelijke overlap en hadden 17 amplicons geen overlap in de NIST-sequentie. Dit resulteerde in 10.000 coördinaten per replicaat ter vergelijking. Niet-variante basebepalingen werden vergeleken met build hg19 van de referentiesequentie van het menselijk genoom. De nauwkeurigheidresultaten worden weergegeven in [Tabel 13](#).

**Tabel 13** Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument voor GM12878 met de NIST-database

Monster	Aantal amplicons	Gemiddeld bepalingpercentage	Totaal aantal TP-variantbepalingen	Totaal aantal FN-variantbepalingen	Totaal aantal TN-bepalingen	Totaal aantal FP-bepalingen	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

De vijf onverdunde monsters werden verder geanalyseerd op het bepalen van kleine inserties en deleties (indels) ([Tabel 14](#)). In sommige gevallen was de indel gebruikelijk bij twee of meer monsters, zoals weergegeven in de kolom Totaal aantal monsterreplicaten met Indel. De resultaten voor beide replicaten van de vijf monsters zijn opgenomen in [Tabel 14](#). Er waren in totaal 71 indels, variërend in grootte van 1-24 bp voor inserties en 1-25 bp voor deleties. Hiervan werden 68 indels elk gedetecteerd met een positieve procentuele overeenkomst van 1. Drie inserties en deleties hadden geen juiste bepalingen omdat elk van deze varianten een niet-bepaling was vanwege het R3x6-filter. Dit is de reden dat de PPA, waarbij niet-bepalingen worden uitgesloten, niet kon worden berekend. De drie varianten waren een 1-bpdeletie (chr8 24811064 AG>A); 2-bpdeletie (chr10 55892600 TAC>T) en 1-bpinsertie (chr17 39589692 C>CA).

**Tabel 14** Samenvatting van Indel-detectie met het MiSeqDx-instrument

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
1	1	36450544	93	25 bp deletie	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp deletie	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp insertie	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp deletie	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp insertie	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp insertie	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp insertie	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp deletie	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp insertie	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp insertie	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
16	2	235016388	73	2 bp insertie	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp deletie	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp insertie	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp deletie	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp deletie	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp insertie	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp deletie	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp insertie	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp deletie	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp deletie	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp deletie	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp deletie	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp insertie	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp deletie	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp insertie	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp deletie	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp deletie	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp deletie	AG>A	15	15	0	0	N.v.t.
53	8	76518677	67	4 bp insertie	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp insertie	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp deletie	TCTGGGGGGCAGCCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp deletie	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp deletie	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp deletie	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp insertie	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp insertie	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp deletie	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp deletie	CTT>C	11	0	0	11	100

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
78	12	2834814	84	21 bp insertie	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp insertie	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp insertie	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp deletie	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp deletie	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp insertie	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp deletie	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp deletie	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp deletie	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp deletie	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp insertie	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp insertie	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp deletie	ATTATTTT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp deletie	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp insertie	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp insertie	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp insertie	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp insertie	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp deletie	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp deletie	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp insertie	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp insertie	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp deletie	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp deletie	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp insertie	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp insertie	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp deletie	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp insertie	G>GATAAAAACCTTA	9	0	0	9	100

Amplicon	Chromosoom	Positie	Geanalyseerde fragmentgrootte	Type en lengte van amplicon-indel	Indel	Totaal aantal monsterreplicaten met indel	Aantal niet-bepalingen	Totaal aantal onjuiste indelbepalingen	Totaal aantal correcte indelbepalingen	PPA
137	21	36710749	87	21 bp deletie	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp deletie	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp insertie	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp insertie	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp deletie	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## Onderzoek 2

Voor dit onderzoek is gebruikgemaakt van opgeslagen FFPE-weefselmonsters van colorectale kanker en een representatieve 2-genassay die werd vergeleken met de referentiemethode, bidirectionele Sanger-sequencing (Sanger). Van de in totaal 1183 proefpersonen hadden 441 proefpersonen geldige Sanger- en representatieve assayresultaten. Bij evaluatie op proefpersoonniveau (Tabel 15) waren 230 van de 441 proefpersonen positief volgens Sanger (mutatie gedetecteerd door Sanger). Hiervan waren 227 positief volgens de representatieve assay. De overige 211 van de 441 proefpersonen waren negatief volgens Sanger (geen mutatie gedetecteerd door Sanger). Hiervan waren 206 positief volgens de representatieve assay. Dit resulteerde in een Positieve Procentuele Overeenkomst (PPA) van 98,7% en een Negatieve Procentuele Overeenkomst (NPA) van 97,6% (Tabel 15).

Tabel 15 Positieve en Negatieve Procentuele Overeenkomst van resultaten op proefpersoonniveau

Representatieve assay	Sanger		Totaal
	Positief	Negatief	
Positief	227 <sup>1</sup>	5	232
Negatief	3 <sup>2</sup>	206	209
Totaal	230	211	441

Performance Samenvatting		
Overeenkomst Statistieken	Puntschatting	Exact 95% BI
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%,99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%,99,2%]

<sup>1</sup>Er waren 224 exacte overeenkomsten voor resultaten bij dezelfde proefpersoon, op het niveau van alle mutaties. Bij twee proefpersonen detecteerde MiSeqDx de door Sanger gedetecteerde mutatie en één extra mutatie. Bij één proefpersoon ontdekten MiSeqDx en Sanger verschillende mutaties.

<sup>2</sup>Bij één proefpersoon werden twee mutaties gedetecteerd door Sanger. Bij twee proefpersonen werd één mutatie gedetecteerd door Sanger.

### Onderzoek 3

In dit onderzoek werden DNA-bibliotheken beoordeeld die waren voorbereid met FFPE-monsters van meerdere weefseltypen. In totaal 109 FFPE-monsters van acht verschillende weefsels (dikke darm, eierstok, pancreas, bijnier, blaas, lever, schildklier en borst) waarbij elk weefseltype door ten minste 11 FFPE-monsters wordt vertegenwoordigd. Het bijnierweefsel omvatte metastase van slokdarm-, long-, dikke-darmtumoren. Het andere weefsel bevatte primaire tumoren. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een representatief assayontwerp om 26 genen te onderzoeken die 21.577 basen op 17 verschillende chromosomen beslaan. Voor in totaal zes verschillende genen (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR*, en *BRAF*) werd Sanger-sequencing uitgevoerd waarbij elke tumor met 1-3 genen Sanger-sequencing onderging, gebaseerd op de verwachte prevalentie van somatische mutaties voor die tumor. De resultaten van Sanger-sequencing identificeerden 39 somatische SNV-mutaties in 33 van de 109 FFPE-monsters. De MiSeqDx identificeerde 36 somatische SNV-mutaties in 32 van de 109 FFPE-monsters met één vals-negatief en twee niet-bepalingen in de variantpositie. PPA was 97,3%. De MiSeqDx identificeerde 78.975 referentiebases uit de 109 FFPE-monsters met 29 vals-positieven ten opzichte van Sanger-sequencing en 3.416 niet-bepalingen. NPA was 99,9%. Een deletie van twee basen was concordant tussen de twee methoden. [Tabel 16](#) biedt een samenvatting van de resultaten per weefseltype.

Tabel 16 Positieve en negatieve procentuele overeenkomst per weefseltype

Weefseltype	Aantal monsters	Totaal aantal varianten	Totaal aantal TP-varianten	Totaal aantal FN-varianten	Totaal aantal TN-bepalingen	Totaal aantal FP-bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	PPA	NPA
Bijnier	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Blaas	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Borst	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Dikke darm	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Lever	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Eierstok	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Pancreas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Schildklier	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Totaal	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

## Reproduceerbaarheid

Er zijn twee onderzoeken uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van het MiSeqDx-instrument te beoordelen met DNA dat uit FFPE-monsters werd geëxtraheerd. Voor onderzoek 1 werden meerdere instrumenten gebruikt. Voor onderzoek 2 werden meerdere locaties gebruikt.

### Onderzoek 1

De reproduceerbaarheid van het MiSeqDx-instrument werd bepaald met behulp van twee instrumenten en twee getrainde operators voor in totaal acht runs. De representatieve assay, amplicon genomische context, monsters en referentiemethode zijn dezelfde als beschreven voor nauwkeurigheidsonderzoek 1 hierboven. De resultaten worden voor elk instrument gepresenteerd per amplicon (Tabel 17) om de reproduceerbaarheid van bepalingen tussen instrumenten aan te tonen. Het percentage correcte bepalingen omvatte zowel onjuiste als niet-bepalingen (aan een of meer filters wordt niet voldaan voor variantbepalingen). De instrumenten genereerden vergelijkbare aantallen niet-bepalingen, afhankelijk van het specifieke amplicon. Er werd één onjuiste bepaling waargenomen binnen een betrouwbaarheidsgebied zoals gedefinieerd door de Platinum Genomes-referentienorm voor MiSeqDx 1. De onjuiste bepaling was een fout-positieve bepaling van een insertievariant in amplicon 64 die chromosoom 10 opvroeg op posities 55892599 tot 55892687. Het amplicon had een dinucleotide-repeat van 11.

Tabel 17 Resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek tussen instrumenten voor het MiSeqDx-instrument (amplicon-niveau)

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	N.v.t.	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	N.v.t.	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	N.v.t.	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
23	4	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	N.v.t.	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	N.v.t.	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	N.v.t.	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0



Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	N.v.t.	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	N.v.t.	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	N.v.t.	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	N.v.t.	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	N.v.t.	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	N.v.t.	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	N.v.t.	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	N.v.t.	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	N.v.t.	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	N.v.t.	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	N.v.t.	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
83	13	73	73	N.v.t.	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	N.v.t.	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	N.v.t.	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	N.v.t.	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	N.v.t.	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
123	18	65	65	N.v.t.	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	N.v.t.	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	N.v.t.	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	N.v.t.	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	N.v.t.	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG (4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	N.v.t.	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	N.v.t.	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0

Amplicon	Chromosoom	Geanalyseerde fragmentgrootte	Bases in zekere regio's	Genomische inhoud van amplicon	GC-inhoud	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen	Totaal aantal correcte bepalingen	Totaal aantal onjuiste bepalingen	Totaal aantal niet-bepalingen
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	N.v.t.	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	N.v.t.	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	N.v.t.	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

De resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek werden per operator geanalyseerd met behulp van variantfrequentie (Tabel 18). Deze analyse toonde aan dat de variantfrequenties consistent waren bij alle operators. Gemiddelde variantfrequenties +/- 1 standaarddeviatie worden gepresenteerd.

Tabel 18 Resultaten tussen operatoren voor het MiSeqDx-instrument

Variantfrequentiebereik	Aantal unieke varianten	Totaal aantal varianten geanalyseerd operator 1	Totaal aantal varianten geanalyseerd operator 2	Gemiddelde (SD) gerapporteerde variantfrequentie operator 1	Gemiddelde (SD) gerapporteerde variantfrequentie operator 2
Hoge frequentie (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Gemiddelde frequentie (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Lage frequentie (3-7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

De resultaten van het reproduceerbaarheidsonderzoek voor elk monster zijn samengesteld uit alle acht runs (Tabel 19). De detectie wordt voor elk varianttype afzonderlijk geëvalueerd: enkelvoudige nucleotide-varianten (SNV's), inserties en deleties afzonderlijk. Referentieposities zijn uitgesloten. Deze analyse toonde aan dat de resultaten voor de varianten reproduceerbaar waren in de monsters.

Tabel 19 Overeenkomst van de resultaten van basebepalingen door het MiSeqDx-instrument per monster

Monster	SNV's				Inserties			Deleties				
	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN	Totaal aantal	Totaal aantal TP	Totaal aantal FP	Totaal aantal FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup>Varianten met een frequentie van meer dan 20%.

<sup>2</sup>Variant met een frequentie van minder dan 20%.

De gegevens van de 8 runs in dit reproduceerbaarheidsonderzoek ondersteunen de claim dat het MiSeqDx-instrument consistent kan sequensen:

- GC-inhoud  $\geq$  19% (alle bepaalde basen in 120 van de 120 gesequencede amplicons met 19% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 3,4%)
- GC-inhoud  $\leq$  73% (alle bepaalde basen in 120 van de 120 gesequencede amplicons met 73% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,1%)
- PolyA-lengtes  $\leq$  8 (PolyA-repeat van 8 nucleotiden werd correct bepaald in 120 van de 120 gesequencede amplicons met PolyA = 8)
- PolyT-lengtes  $\leq$  10 (PolyT-repeat van 10 nucleotiden werd correct bepaald in 120 van de 120 gesequencede amplicons met PolyT = 10)
- PolyG-lengtes  $\leq$  6 (PolyG-repeat van 6 nucleotiden werd correct bepaald in 720 van de 720 gesequencede amplicons met PolyG = 6)
- PolyC-lengtes  $\leq$  6 (PolyC-repeat van 6 nucleotiden werd correct bepaald in 359 van de 360 gesequencede amplicons met PolyC = 6, met 1 niet-bepaling)

- Dinucleotide-repeatlengtes  $\leq 4x$  (alle bepaalde basen in 600 van de 600 gesequencede amplicons met 4x dinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,4%)
- Trinucleotide-repeatlengtes  $\leq 5x$  (alle bepaalde basen in 120 van de 120 gesequencede amplicons met 5x trinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 1,9%)
- 24 of minder base-inserties en 25 of minder base-deleties
  - 24-base-inserties correct bepaald in 120 van de 120 monsters
  - 25 base-deleties correct bepaald in 182 monsters en gerapporteerd als niet-bepaling in 2 van de 184 monsters

## Onderzoek 2

Er is een extern onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de representatieve 2-genassay, beschreven in nauwkeurigheidsonderzoek 2, te beoordelen op drie externe testlocaties (twee operators per locatie), één reagenspartij en drie niet-openvolgende testdagen. De testen werden uitgevoerd met zes goed gekarakteriseerde monsterpanels van genomisch DNA-monsters van klinische FFPE-monsters of cellijnen. Elk panel bestond uit 10 leden, voor een totaal van 60 leden verdeeld over de panels.

De 60 panelleden bestonden uit duplicaten van vier unieke wild-type (voor panelmutaties) monsters, 12 unieke mutante monsters (met een enkele mutatie) bereid op zowel hoge als lage mutatiefrequentieniveaus, en twee unieke mutante monsters (met een enkele mutatie) alleen bereid op een laag mutatiefrequentieniveau. Elk uniek monster/mutatiefrequentieniveaumonster (in tweevoud getest in elke run) had 36 mogelijke resultaten (2 replicaten  $\times$  2 operators  $\times$  3 dagen  $\times$  3 locaties) als alle resultaten geldig waren.

PEC (Percent Expected Call, percentage verwachte bepalingen) voor alle positieve en negatieve varianten werd geëvalueerd door het representatieve assayresultaat te vergelijken met het verwachte mutatieresultaat (verwachte mutatie gedetecteerd of niet gedetecteerd) in elk monster. PEC wordt berekend als 100% maal het aantal verwachte bepalingen gedeeld door het aantal pogingen tot bepalingen. Het tweezijdige 95% betrouwbaarheidsinterval wordt berekend met behulp van de Wilson-scoremethode

Na combinatie van locaties waren de slagingspercentages van monsters  $\geq 94,7\%$  voor de eerste run van het monster of in monsters die werden getest in runs die geldig waren bij de eerste doorgang. PEC op mutatieniveau voor alle mutante monsters was 99,6% (905/909) (95% BI; 98,9; 99,8). Het aantal pogingen tot bepalingen over alle 56 panelmutaties (ongeacht of een gedetecteerde mutatie werd verwacht of niet) voor alle geldige monsters was 58.856 (56  $\times$  1051). Van deze 58.856 waarnemingen op mutatieniveau waren er slechts zes incidenten waarbij de waargenomen en verwachte resultaten niet overeenkwamen. PEC op mutatieniveau voor alle positieve en negatieve varianten van alle mutante en wild-type panelleden samen was 99,99% (58.850/58.856).



## Analytische gevoeligheid LoB (Limit of Blank, blancolimiet) en LoD (Limit of Detection, detectielimiet)

In dit onderzoek werden de grenswaarde van de assay geverifieerd en werd de detectielimiet (LoD) voor de MiSeqDx bepaald met een representatief panel. Kort gezegd, werden de goed gekarakteriseerde Platinum Genome-cellijnen GM12878 en GM12877 gefixeerd in formaline en ingebed in paraffine, waarna er DNA werd geëxtraheerd. GM12878 werd zodanig verdund met GM12877 dat de variantfrequenties van zeventig varianten (52 SNV's, negen inserties en negen deleties) bijna 0,05 waren. De twee DNA-monsters werden getest door twee operators, met behulp van twee instrumenten en twee partijen reagentia, voor in totaal 10 MiSeqDx-sequencing-runs. Dit resulteerde in 40 replicaten voor elke variant in GM12878 en 60 replicaten voor elke overeenkomstige wild-type-coördinaat in GM12877 voor elke reagenspartij. De LoB en LoD werden berekend met behulp van de klassieke benadering vermeld in CLSI EP17-A2 met de niet-parametrische optie. De LoB en LoD werden afzonderlijk berekend voor SNV's, inserties en deleties door de variantfrequenties voor een bepaald varianttype te poolen. De type I-fout werd gedefinieerd als 0,01 en de type II-fout werd gedefinieerd als 0,05.

Voor de LoB werden de gepoolde variantfrequenties gesorteerd van laag naar hoog en werd de 99e rangpositie voor elke reagenspartij voor elk varianttype berekend (Tabel 20). De MiSeqDx-software gebruikt een cut-off (de effectieve LoB) van 0,026 variantfrequentie voor het bepalen van de kwalitatieve detectie van varianten. De berekende blancolimiet (LoB) bevestigde dat deze cut-off resulteert in een type I-fout van niet meer dan 0,01.

Tabel 20 Blancolimiet

Varianttype	Totaal aantal variantfrequenties	LoB reagenspartij 1 (%)	LoB reagenspartij 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insertie	540	0,79	0,60
Deletie	540	0,96	0,84

Voor de LoD werd het percentage berekend van de individuele mutatiefrequentie voor elke reagenspartij voor elk varianttype dat onder de grenswaarde van 0,026 viel (Tabel 21). Omdat de percentages lager waren dan de type II-fout van 5% (0,05), werd het gemiddelde van de gecombineerde variantfrequenties berekend als de LoD (Tabel 21). De LoD voor elk varianttype werd genomen als de grootste van de twee waarden berekend voor de twee reagentiapartijen: 5,45% voor SNV's, 4,88% voor inserties en 5,44% voor deleties.

Tabel 21 Detectielimiet

Reagenspartij	Varianttype	Totaal aantal variantfrequenties	Aantal VF-metingen < 2,6%	Percentage VF-metingen < 2,6%	Detectielimiet (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Insertie	360	0	0,00	4,86
	Deletie	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insertie	360	0	0,00	4,88
	Deletie	360	0	0,00	5,24

De volgende onderzoeken tonen de prestatiekenmerken van de MiSeqDx met een andere representatieve assay gericht op 56 mutaties in twee klinisch relevante kankergenen (Mutatiepanel). Het mutatiepanel is ontworpen om specifiek 56 mutaties te detecteren in twee klinisch relevante kankergenen (Gen 1 en Gen 2). De assay bepaalt gelijktijdig de aan- of afwezigheid van elk van de 56 mutaties in elk gesequenced monster. De referentiemethode voor deze onderzoeken was bidirectionele Sanger-sequencing.

### Nauwkeurigheid tussen partijen

Er is een nauwkeurigheidsonderzoek tussen partijen uitgevoerd om de prestaties van het MiSeqDx-instrument te evalueren voor geproduceerde reagenskitpartijen (bestaande uit monsterkwalificatie, bibliotheekvoorbereiding en sequencing-reagentia). Hierbij werd gebruikgemaakt van de representatieve assay met twee genen met behulp van een panel van vijf gemengde FFPE-monsters die voldoen aan de kwalificatievereisten voor monsters. Elk FFPE-monster bevatte twee unieke mutaties: één op een lager (ongeveer 8%) mutatiefrequentieniveau en één op een hoog (ongeveer 14%) mutatiefrequentieniveau. Twaalf (12) waarnemingen van elk van de vijf monsternengsels werden verzameld gedurende drie niet-openvolgende dagen met drie partijen reagenskit. Het totale aantal waarnemingen voor het onderzoek voor alle reagenspartijen was 180 waarnemingen voor alle monsternengsels en 360 waarnemingen voor alle mutatiefrequentieniveaus. Over alle partijen en dagen liet 99,7% (359/360) van de waarnemingen het verwachte mutatiresultaat zien. Eén laagfrequente mutatie werd ten onrechte als wild-type bepaald. Er werd een variantiecomponentanalyse uitgevoerd voor elk van de mutaties/mutatiefrequentieniveaus om de variabiliteit van het systeem te schatten. De totale standaarddeviatie varieerde van 0,011 tot 0,029. De reagenspartijcomponent van de totale standaarddeviatie varieerde van 0 tot 0,015.

## Revisiegeschiedenis

Documentnr.	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200006218 v02	Oktober 2023	Verwijzingen naar Local Run Manager voor versie 4 bijgewerkt. De etikettering is bijgewerkt met toevoeging van Australische sponsorgegevens. Discrepancies gecorrigeerd waarbij de bijsluiter verschilt van het instrumentverificatieonderzoeksrapport voor MiSeqDx.
Documentnr. 200006218 v01	Mei 2022	MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro Package Insert CN toegevoegd aan Meegeleverde, maar niet benodigde apparatuur. Testinformatie toegevoegd voor MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro aan Prestatiekenmerken. Specifieke waarschuwing voor de VS verwijderd uit Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.
Documentnr. 200006218 v00	November 2021	Eerste versie ter ondersteuning van MOS v4.0 en Local Run Manager v3.0.

## Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina') en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van het/de hierin beschreven product(en) en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd. Illumina verleent met dit document geen licenties onder zijn octrooi-, handelsmerk-, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van het/de hierin beschreven product(en) te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijk(e) product(en) worden gebruikt.

**HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET/DE PRODUCT(EN).**

ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of van hun respectievelijke eigenaren. Ga naar [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html) voor informatie over specifieke handelsmerken.

## Contactgegevens



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, Californië 92122 VS  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



EC REP



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

### Australische sponsor

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

## Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die op de verpakkingen en labels van de producten staan, de symbolenlijst voor uw kit op [support.illumina.com](http://support.illumina.com) op het tabblad *Documentation* (Documentatie).