

# Kystisen fibroosin TruSight-pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN

Luettelonumero 20036925: 1–4 ajoa, enintään 96 näytettä/sarja

## Tuotteen yleiskuvaus

TruSight™ Cystic Fibrosis Library Prep on kirjaston valmistelusarja, joka tukee kystisen fibroosin TruSight-139-varianttimääritystä ja kystisen fibroosin kliinisen sekvensoinnin TruSight-määritystä.

## Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen käyttötarkoitus

Kystisen fibroosin TruSight-139-varianttimääritys (tunnettiin aiemmin nimellä Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin 139-varianttimääritys) on laadullinen *in vitro* -diagnostiikkajärjestelmä, jota käytetään havaitsemaan samanaikaisesti 139 kliinisesti merkityksellistä kystistä fibroositautia aiheuttavaa mutaatiota ja kystisen fibroosin solukalvojen välisen johtavuuden säätelygeenin (CFTR) variantteja genomi-DNA:sta, joka on eristetty ihmisen perifeerisestä kokoverinäytteestä. Variantteihin kuuluvat American College of Medical Genetics (ACMG) -järjestön vuonna 2004 suosittelemat variantit<sup>1</sup> ja vuonna 2011 American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) -järjestön suosittelemat variantit.<sup>2</sup> Testi on tarkoitettu kantajaseulontaan lisääntymisikäisille aikuisille, vastasyntyneiden ja lasten varmistusdiagnostiikkatestaukseen sekä alustavaksi testiksi, joka auttaa diagnosoimaan henkilöitä, joilla epäillään kystistä fibroosia. Testin tulokset on tarkoitettu virallisesti hyväksytyyn kliiniseen molekyylogeneetikon tai vastaavan ammattilaisen tulkitsemaksi, ja niitä on käytettävä yhdessä muiden saatavilla olevien laboratoriotietojen ja kliinisten tietojen kanssa.

Tätä testiä ei ole tarkoitettu vastasyntyneiden seulontaan, sikiön diagnostiseen testaukseen, implantointia edeltävään testaukseen tai erillisiin diagnostisiin tarkoituksiin.

Testi on tarkoitettu käytettäväksi Illumina MiSeqDx -laitteella.

## Kystisen fibroosin kliinisen TruSight-sekvensointimäärityksen käyttötarkoitus

TruSight-kystisen fibroosin kliininen sekvenssimääritys (aiemmin Illumina MiSeqDx-kystisen fibroosin kliininen sekvenssimääritys) on kohdennettu sekvensoiva *in vitro* -diagnostiikkajärjestelmä joka uudelleensekvensoi K<sub>2</sub>EDTA:sta kerätyistä ihmisen perifeerisistä kokoverinäytteistä eristettyjä proteiinikoodausalueita ja kystisen fibroosin solukalvojen välisen johtavuuden säätimen (CFTR) geenin intron-/exon-rajoja. Testi havaitsee yksittäisiä nukleotidivariantteja ja pieniä indeleitä sekvensoidulla alueella ja raportoi lisäksi kahdesta syvästä intronimutaatiosta ja kahdesta suuresta deleetiosta. Testi on tarkoitettu käytettäväksi Illumina MiSeqDx -laitteella.

Tämä testi on tarkoitettu diagnostiseksi avuksi sellaisten henkilöiden diagnosoinnissa, joilla epäillään kystistä fibroosia. Tämä testi on sopivin, kun potilaalla on epätyypillinen kystisen fibroosin oirekuva tai kun muut mutaatiopaneelit eivät ole tunnistanee molempia kausaalisia mutaatioita. Testin tulokset on tarkoitettu virallisesti hyväksytyyn kliiniseen molekyylogeneetikon tai vastaavan ammattilaisen tulkitsemaksi, ja niitä on käytettävä yhdessä muiden saatavilla olevien tietojen kanssa, mukaan lukien kliiniset oireet, muut diagnostiset testit ja sukuhistoria.

Tätä testiä ei ole tarkoitettu käytettäväksi erillisdiagnostiikkatarkoituksiin, sikiödiagnostiikkatestaukseen, implantointia edeltävään testaukseen, kantajaseulontaan, vastasyntyneiden seulontaan tai väestötason seulontaan.

## Kystisen fibroosin tausta

### Kliininen kuvaus

Kystinen fibroosi (KF) on yksi länsimaiden yleisimmistä geneettisistä häiriöistä ja yleisin hengenvaarallinen autosomaalinen resessiivinen häiriö ei-latinalaisamerikkalaisessa valkoisessa väestössä.<sup>3-7</sup> KF vaikuttaa limaeritteiden viskositeettiin ja vaikuttaa hengitysteiden, haiman, suoliston, maksa-sappi-järjestelmän, miesten sukuelinten ja hikirauhasten epiteeliin, mikä johtaa monimutkaiseen monen elimen ja järjestelmän sairauteen<sup>4-6</sup> keuhkojen ollessa ensisijainen elinjärjestelmä, joka liittyy sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen.<sup>8</sup> Monissa tapauksissa ravinnon saannin väheneminen edeltää KF-keuhkosairauden etenemistä. Nykyisten hoidollisten interventiotoimien keskeinen painopiste on varhainen diagnosointi vastasyntyneiden seulonnan avulla<sup>7</sup>, mikä helpottaa elintärkeiden lääketieteellisten palvelujen oikea-aikaista saatavuutta ja mahdollistaa parhaan mahdollisen lopputuloksen sairastuneille potilaille.<sup>4,7</sup> Vaikka selviytymisajassa on sukupuolieroja, ja mediaanielinajan on raportoitu olevan suurempi miehillä kuin naisilla, kokonaiselinajan mediaani on Yhdysvalloissa 38,3 vuotta KF-potilailla.<sup>8</sup>

### CFTR-variantit ja esiintyvyys

Vuonna 1989 tunnistettu kystisen fibroosin solukalvojen välisen johtavuuden säätelygeeni (CFTR) sijaitsee kromosomi 7:n pitkässä varressa ja sisältää 27 koodauseksonia, jotka ovat levinneet 230 kb:lle.<sup>4</sup> Normaalin alleelin tuottama 6,5 kb:n mRNA koodaa CFTR:n, 1 490 aminohapon integraalisen kalvoproteiinin, joka toimii säänneltynä kloridikanavana useiden elinten epiteelisoluissa.<sup>4,5</sup> Tällä hetkellä on kuvattuna yli 1 900 CFTR-varianttia, joista suurin osa on pistemutaatioita.<sup>9</sup> Yleisin CFTR-variantti on F508del-alleeli,<sup>5</sup> joka kattaa lähes 70 % kaikista CFTR-varianteista.<sup>3</sup> Muut yleiset CFTR-variantit johtavat kuitenkin usein KF-fenotyyppiin ja muihin CFTR-liitännäisiin häiriötiloihin.<sup>3-5</sup>

Kystisen fibroosin esiintyvyyden arvioidaan olevan yhdellä 2 000–4 000 elävänä syntyneestä ja esiintyvyyden noin 30 000 yksilöllä Yhdysvaltain väestössä.<sup>4</sup> Sitä esiintyy kaikissa etnisissä ja rodullisissa väestöissä eri esiintyvyyksillä: yhdellä 3 000 valkoihoisesta, yhdellä 9 200 latinalaisamerikkalaisesta, yhdellä 10 900 alkuperäisamerikkalaisesta, yhdellä 15 000 afroamerikkalaisesta ja yhdellä 31 000 aasialaisesta amerikkalaisesta.<sup>4,6</sup> **Taulukko 1** on esitetty nykyiset arviot CFTR-mutaation kantajaesiintyvyydestä etnisyyden mukaan Yhdysvalloissa. Arvio perustuu 364 890 yksilön joukkoon, joka ohjattiin kantajakokeisiin ilman KF-sukuhistoriaa.

Taulukko 1 Yleinen kystisen fibroosin mutaation kantajan yleisyys eri etnisissä ryhmissä Yhdysvalloissa<sup>10</sup>

Etninen ryhmä	Havaittu kantajuuden yleisyys
Afrikkalaisamerikkalainen	1/84
Ashkenazi-juutalainen	1/29
Aasialainen	1/242
Kaukasialainen	1/28
Latino	1/59
Juutalainen	1/32
Lähi-itäläinen	1/91
Alkuperäisamerikkalainen	1/70
Eteläaasialainen	1/118
Muu etnisyyys	1/111
Muu etnisyyys: > 1 etnisyyys	1/34
Muu etnisyyys: osaksi afrikkalaisamerikkalainen	1/56
Muu etnisyyys: osaksi kaukasialainen	1/32
Muu etnisyyys: osaksi latino	1/51
Ei ilmoitettu	1/37
Kaikki yksilöt	1/38

## Kystisen fibroosin 139-variantin määrityksen yhteenveto ja selitys

### CFTR2-hankkeen yleiskatsaus

CFTR2-hanke on kansainvälinen aloite, jota johtaa tutkija- ja kliinikkoryhmä ja jota tuetaan National Institute of Healthin ja U.S. Cystic Fibrosis Foundationin apurahalla.<sup>11,12</sup> CFTR2-hankkeen tarkoituksena on tuottaa kattavia ja asiantuntijoiden arvioimia funktionaalisia ja kliinisiä tietoja CFTR-varianteista. Kaikkien CF-varianttien, joiden alleelitaajuudet ovat 0,01% tai enemmän, kliiniseksi arvioimiseksi 25 KF-rekisteriä ja KF-klinikkaa ympäri maailmaa<sup>13</sup> yhdistivät resurssinsa tavoitteenaan yhdistää yli 39 000 KF-potilaan kliiniset tiedot lähes 1 900 KF-variantista, jotka oli vuosien varrella kirjattu CFTR1-tietokantaan Toronton lastensairaalassa.<sup>11,13</sup> Kliiniset ominaisuudet, kuten hien kloridipitoisuus, keuhkojen toiminta (FEV1% ennustettuna) ja haiman tila analysoitiin CFTR-genotyyppitietojen yhteydessä. Systemaattinen lähestymistapa näiden varianttien samanaikaiseen analysointiin kliinisistä, toiminnallisista ja geneettisistä näkökulmista tuotti tuloksena tiedot 134 yksilöllisestä KF:a aiheuttavasta variantista 129 yksilöllisessä genomipaikassa (koska viidessä paikassa kaksi nukleotidimuutosta näkyy samassa paikassa), jotka ovat CFTR2-tietokannassa (elokuusta 2013 alkaen). Kaikista näistä varianteista koostuvan paneelin käytön odotetaan kattavan 95,4 prosenttia kystistä fibroosia aiheuttavista alleleista ja lisäävän riskiparien tunnistamista havaitsemalla molemmat alleelit ~91-prosenttisesti 72-prosenttisestä tunnistuksesta ACMG:n suosittamalla 23 variantin paneelilla.

### Paneelin CFTR-variantit

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen raportoimat variantit valittiin erityisesti siksi, että ne edustavat kaikkia kliinisesti validoituja variantteja, jotka on luokiteltu kystistä fibroosia aiheuttaviksi CFTR2-tietokannassa Johns Hopkins -yliopistossa. Tietokanta CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR) -aloitteen tuote.

Määritys testaa seuraavat tekijät: 134 kystistä fibroosia aiheuttavaa varianttia, yhden ACMG:n suosittelman paneelivariantin (R117H, CFTR2 luokitellut vaihtelevan kliinisen merkityksen mutaatioksi, MVCC); yhden ehdollisesti raportoidun muokkaavan variantin (PolyTG/PolyT); ja kolme ehdollisesti raportoitua hyvälaatuista varianttia (I506V, I507V, F508C)<sup>14</sup>; eli yhteensä 139 raportoitua varianttia.

134 kystistä fibroosia aiheuttavaa varianttia vastaa 129 kystistä fibroosia aiheuttavaa varianttia CFTR2-tietokannassa. CFTR2-tietokanta sisältää viisi kystistä fibroosia aiheuttavaa varianttia, joissa sama proteiinitason muutos voi aiheutua kahden eri nukleotidin vaihtumisesta (esim. S466X(C>A) ja S466X(C>G)). Nämä viisi varianttia on lueteltu aminohappokodonin mukaan CFTR2-tietokannassa (esim. S466X), vaikka määrittäminen raportoi jokaisen yksittäisen variantin (esim. S466X(C>A) ja S466X(C>G)). Kystisen fibroosin 139 variantin määrittäminen raportoitujen 139 variantin luettelon esittää **Taulukko 2**. Lihavoitu=ACMG-23; Kursivoitu=Ehdollisesti raportoitu.

Taulukko 2 Kystisen fibroosin 139-varianttimääritys Yhteenveto varianteista

[Variantit on lueteltu genomikoordinaattijärjestyksessä, ja kunkin variantin nukleotiditaso on sulkeissa.]

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	<b>R553X (c.1657C&gt;T)</b>	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	<b>R560T (c.1679G&gt;C)</b>	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	<b>R347P (c.1040G&gt;C)</b>	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)
R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
<b>G85E (c.254G&gt;A)</b>	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	<b>1898+1G&gt;A (c.1766+1G&gt;A)</b>	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X (c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X (c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	<b>2184delA (c.2052delA)</b>	<b>R1162X (c.3484C&gt;T)</b>
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	<b>3659delC (c.3528delC)</b>
457TAT>G (c.325_327delTATinsG)	<b>A455E (c.1364C&gt;A)</b>	R709X (c.2125C>T)	S1196X (c.3587C>G)
D110H (c.328G>C)	1525-1G>A (c.1393-1G>A)	K710X (c.2128A>T)	W1204X (c.3611G>A)
R117C (c.349C>T)	S466X (C>A) (c.1397C>A)	2307insA (c.2175_2176insA)	W1204X (c.3612G>A)
<b>R117H (c.350G&gt;A)</b>	S466X (C>G) (c.1397C>G)	L732X (c.2195T>G)	3791delC (c.3659delC)
Y122X (c.366T>A)	L467P (c.1400T>C)	2347delG (c.2215delG)	<b>3849+10kbC&gt;T (c.3717+12191C&gt;T)</b>
574delA (c.442delA)	1548delG (c.1418delG) <sup>†</sup>	R764X (c.2290C>T)	G1244E (c.3731G>A)
<b>621+1G&gt;T (c.489+1G&gt;T)</b>	S489X (c.1466C>A)	2585delT (c.2453delT)	3876delA (c.3744delA)
663delT (c.531delT)	S492F (c.1475C>T)	E822X (c.2464G>T)	S1251N (c.3752G>A)
G178R (c.532G>A)	Q493X (c.1477C>T)	2622+1G>A (c.2490+1G>A)	3905insT (c.3773_3774insT)
<b>711+1G&gt;T (c.579+1G&gt;T)</b>	<b>I507del (c.1519_1521delATC)</b>	E831X (c.2491G>T)	<b>W1282X (c.3846G&gt;A)</b>
711+3A>G (c.579+3A>G)	<b>F508del (c.1521_1523delCTT)</b>	W846X (c.2537G>A)	4005+1G>A (c.3873+1G>A)
711+5G>A (c.579+5G>A)	1677delTA (c.1545_1546delTA)	R851X (c.2551C>T)	4016insT (c.3884_3885insT)

712-1G>T (c.580-1G>T)	V520F (c.1558G>T)	2711delT (c.2583delT)	<b>N1303K (c.3909C&gt;G)</b>
H199Y (c.595C>T)	Q525X (c.1573C>T) <sup>†</sup>	<b>2789+5G&gt;A (c.2657+5G&gt;A)</b>	Q1313X (c.3937C>T)
P205S (c.613C>T)	1717-8G>A (c.1585-8G>A)	Q890X (c.2668C>T)	4209TGTT>AA (c.4077_4080delTGTTinsAA)
L206W (c.617T>G)	<b>1717-1G&gt;A (c.1585-1G&gt;A)</b>	L927P (c.2780T>C)	CFTRdele22,23 (c.3964-78_4242+577del)
Q220X (c.658C>T)	<b>G542X (c.1624G&gt;T)</b>	S945L (c.2834C>T)	4382delA (c.4251delA)
852del22 (c.720_741delAGGGAGAATGATGATGAAGTAC)	S549R (c.1645A>C)	3007delG (c.2875delG)	<i>PolyTG/PolyT</i>
1078delT (c.948delT)	S549N (c.1646G>A)	G970R (c.2908G>C)	<i>I506V (c.1516A&gt;G)</i>
G330X (c.988G>T)	S549R (c.1647T>G)	3120G>A (c.2988G>A)	<i>I507V (c.1519A&gt;G)</i>
<b>R334W (c.1000C&gt;T)</b>	<b>G551D (c.1652G&gt;A)</b>	<b>3120+1G&gt;A (c.2988+1G&gt;A)</b>	<i>F508C (c.1523T&gt;G)</i>
I336K (c.1007T>A)	Q552X (c.1654C>T)	3121-1G>A (c.2989-1G>A)	

<sup>†</sup> Luokiteltu CFTR2-tietokannassa<sup>12</sup> kystistä fibroosia aiheuttavaksi variantiksi, kun taas Sosnayn artikkeli<sup>13</sup> luokittelee variantin määrittämättömäksi. Tietokannan luokittelu on ajantasaisempi ja heijastaa valmista funktionaalista testausta, jota ei ollut saatavilla, kun Sosnayn artikkeli julkaistiin.

## Kystisen fibroosin kliinisen sekvensoinnin määrittämisen yhteenveto ja selitys

### Määrittämisen rakenne

Kaikki CFTR-geenin proteiinia koodaavat alueet, mukaan lukien 10 nukleotidia viereisestä intronisekvenssistä, tunnistetaan kaikista eksoneista kolmea (eksonit 7, 10 ja 20) lukuun ottamatta. Eksonin 7 ja eksonin 10 osalta vain 5 nukleotidia viereisestä intronisekvenssistä sisällytetään eksonin 5'-päähän, jotta vältetään proksimaalinen homopolymeerinen insertio-deleetio. Eksonin 20 kohdalla tyypin "30 nt flanking" introninen sekvenssi sisällytetään eksonin 5'-päässä, jotta voidaan tunnistaa mutaatio 3272-26A>G. Lisäksi määrittäminen havaitsee myös viereisen sekvenssin ~100 nt viereisen sekvenssin 5'- ja 3'-pään kääntämättömillä alueilla (UTR), 2 syvää intronimutaatiota (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), 2 suurta deleetiota (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) ja PolyTG/PolyT-alueen. **Taulukko 3** esittää määrittämisen koko kattavuuden luetelluissa genomikoordinaattisijainneissa.



#### HUOMAUTUS:

Deleetioiden havaitsemiselle tietyissä genomipaikoissa tämän määrittämisen sekvenssialueilla on rajoituksia (katso *Toimenpiteen rajoitukset kystisen fibroosin kliinisessä sekvensointimäärittämisessä sivulla 9*).

Taulukko 3 Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärittämisen genomikoordinaattien kattavuus

	hg19-genomikoordinaatin alku (chr7)	hg19-genomikoordinaatin loppu (chr7)	Pituus (emäspari)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7 <sup>^</sup>	117176597	117176737	141

	hg19-genomikoordinaatin alku (chr7)	hg19-genomikoordinaatin loppu (chr7)	Pituus (emäspari)
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10 <sup>^</sup>	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115
CFTR_Intron 12 <sup>*</sup>	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20 <sup>#</sup>	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22 <sup>*</sup>	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
Emäksiä yhteensä			5 203 <sup>**</sup>

Eksonin 7 ja eksonin 10 osalta vain 5 nukleotidia viereisestä intronisekvenssistä sisällytetään eksonin alkupäähän, jotta vältetään homopolymeeriset venymät näillä alueilla. Eksonin 10 tapauksessa tämä on PolyT / Poly TG -alue intronissa 9. Tätä aluetta käsitellään erityisesti ja erikseen.

\* Syvien intronimutaatioiden kohdalla otetaan mukaan myös 5 nukleotidia, jotka ovat SNV:n kummallakin puolella.

# Eksonista 20 viereiseen intronisekvenssiin sisällytetään 30 nukleotidia eksonin 5'-päähän, jotta voidaan havaita mutaatio 3272-26A>G.

\*\* Kahdella suurella deleetiolla ja PolyTG/PolyT-alueilla sijaintien/alueiden kokonaismäärä on 5 206.

## Menetelmän periaatteet

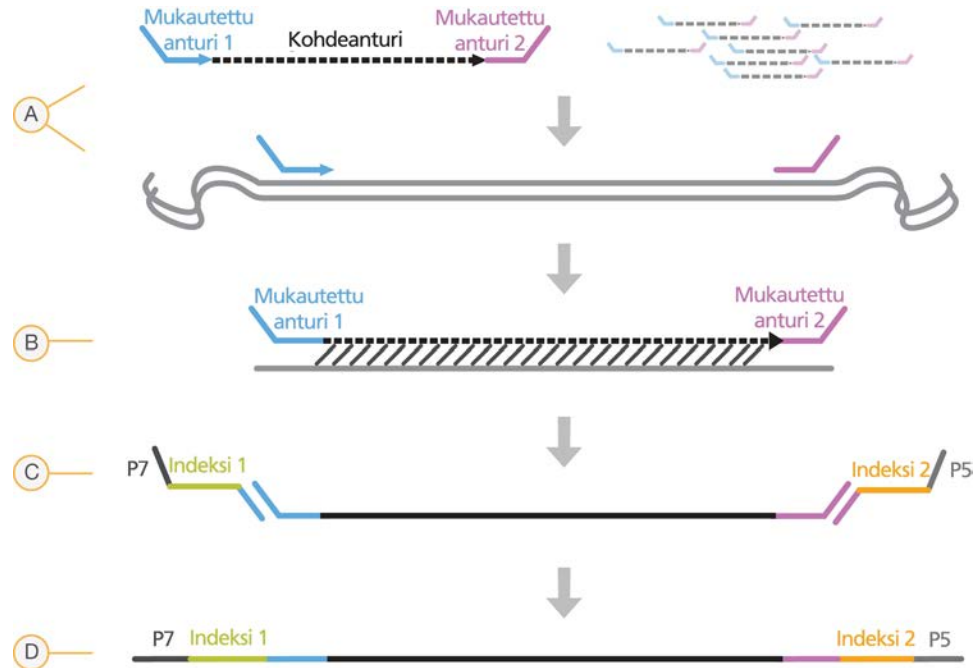
Kystisen fibroosin TruSight-kirjaston valmistelu on tarkoitettu kirjastojen manuaaliseen valmisteluun, kun niitä käytetään DNA:n sekvensointiin perifeerisestä kokoverestä. Kirjaston valmistelu koostuu neljästä keskeisestä vaiheesta: hybridisaatiosta, laajennuksen ligaatiosta, PCR-monistuksesta ja kirjaston normalisoinnista.



### HUOMAUTUS

Kirjaston valmistelutoimenpiteet kystisen fibroosin 139-varianttimääritystä ja kliinistä sekvenssimääritystä varten ovat samanlaiset.

## Kirjaston valmistelu



- A **Hybridisaatio** – Ensimmäinen vaihe eli hybridisaatio hybridisoi kystisen fibroosin geenille ominaisen oligonukleotidipoolin ylä- ja alasuuntaan genomi-DNA:lle. Tämän prosessin lopussa kolmivaiheinen pesu, jossa käytetään koon suhteen selektiivistä suodatinta, poistaa genomi-DNA:sta sitomattomat oligonukleotidit.
- B **Laajennus-ligaatio** – Toinen vaihe eli laajennus-ligaatio yhdistää hybridisoidut ylä- ja alasuunnan oligonukleotidit. DNA-polymeraasi ulottuu yläsuunnan oligonukleotideista kohdealueen läpi, minkä jälkeen tapahtuu ligaatio alasuunnan oligonukleotidin 5'-päähän DNA-ligaasin avulla. Tuloksena on sellaisten tuotosten muodostuminen, jotka sisältävät KF-spesifisiä oligonukleotideja, joita reunustavat monistukseen tarvittavat sekvenssit.
- C **PCR-monistus** – Kolmas vaihe eli PCR-monistus monistaa laajennus-ligaatiotuotoksia käyttämällä indeksisovittimia, jotka lisäävät indeksisekvenssejä näytteen multipleksointia varten, sekä yleisiä sovittimia, joita tarvitaan klusterin luontiin MiSeqDx:ssä. Tämän prosessin lopussa PCR-puhdistusmenettely puhdistaa PCR-tuotokset (joita kutsutaan kirjastoksi).
- D **Kirjaston normalisointi** – Viimeinen vaihe eli kirjaston normalisointi normalisoi kunkin kirjaston määrän, jotta kirjaston edustus olisi tasaisempi lopullisessa poolatussa kirjastossa. Tämän prosessin lopussa poolattu kirjasto ladataan MiSeqDx-laitteeseen sekvensoivaa SBS-kemialla käyttäen.

## Sekvensointi

SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää yksittäisten nukleotidimästen toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-säikeisiin. Jokaisen sekvensointisyklin aikana nukleinihappopoketjuun lisätään yksi fluoresoivasti merkitty deoksinukleotiditriposfaatti (dNTP). Nukleotidimerkintä toimii polymerisaation terminaattorina, joten jokaisen dNTP-lisäyksen jälkeen fluoresoiva väriaine kuvannetaan emäksen tunnistamiseksi, jonka jälkeen tehdään entsyymaattinen halkaisu, jotta seuraava nukleotidi voidaan lisätä. Koska kaikki neljä palautuvaa terminaattorisidottua dNTP:tä (A, G, T, C) ovat läsnä yksittäisinä, erillisinä molekyyleinä, luonnollinen kilpailu minimoi sisällytysvääristymän. Emästunnistukset tehdään suoraan signaalin voimakkuusmittauksista kunkin sekvensointisyklin yhteydessä. Tuloksena on emäskohtainen sekvensointi.

## Tieteanalyysi

Data-analyysin ensimmäistä vaihetta kutsutaan ensisijaiseksi analyysiksi. Tämä prosessi toteutetaan RTA (Real Time Analysis) -ohjelmistolla, ja se luo emästunnistukset ja tekee laadun pisteytyksen. Seuraavassa vaiheessa, jota kutsutaan toissijaiseksi analyysiksi, ensisijaisen analyysin aikana luodut emästunnistukset käsitellään ja luodaan tietoja kustakin näytteestä. Local Run Manager -ohjelmiston suorittama toissijainen analyysi sisältää demultipleksoinnin, FASTQ-tiedostojen luonnin, kohdistuksen, varianttien tunnistuksen ja VCF-tiedostojen, jotka sisältävät tietoja viitegenomin tietyissä paikoissa löydettyistä varianteista, luonnin.

- ▶ **Demultipleksointi** – Jos ajo sisältää useita näytteitä ja ajossa on indeksien readeja, tämä on toissijaisen analyysin ensimmäinen vaihe. Demultipleksointi erottaa tiedot poolatuista näytteistä PCR-monistusvaiheen aikana lisättyjen yksilöllisten sekvenssi-indeksien perusteella.
- ▶ **FASTQ-tiedoston luominen** – Demultipleksoinnin jälkeen Local Run Manager -ohjelmistossa luodaan välianalyysitiedostoja FASTQ-muodossa. Se on tekstimuoto, jota käytetään sekvenssien esittämiseen FASTQ-tiedostot sisältävät kunkin näytteen readit ja laatuasteet, lukuun ottamatta readeja kaikista niistä klustereista, jotka eivät läpäisseet suodatinta.
- ▶ **Kohdistus** – Kohdistus vertaa sekvenssejä referenssiin tunnistaakseen sekvenssien välisen suhteen ja määrittää pistemäärän samankaltaisten alueiden perusteella. Kohdistetut readit kirjoitetaan tiedostoihin BAM-muodossa. Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen osalta Smith-Waterman-algoritmi suorittaa paikallisia sekvenssien kohdistuksia määrittääkseen samankaltaiset alueet kahden sekvenssin välillä.
- ▶ **Varianttien tunnistus** – Tämä vaihe tallentaa yksittäiset nukleotidivariantit (SNV), lisäykset ja deleetiot (indelit) ja muut rakenteelliset variantit standardoituun tekstitiedostoon nimeltä TruSightCF139VariantAssay.txt kystisen fibroosin 139-varianttimääritykselle tai TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt kystisen fibroosin kliinisen sekvensoinnin määritykselle.

Lisätietoja analyysin työnkulusta on MiSeqDx:n mukana asennetun analyysiohjelmiston oppaissa. *Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module -työnkulkuopas*, katso (asiakirjanumero 1000000100945). *Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module -työnkulkuopas*, katso (asiakirjanumero 1000000100946). *Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module -työnkulkuopas*, katso (asiakirjanumero 200017946). *Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module -työnkulkuopas*, katso (asiakirjanumero 200017945).

## Toimenpiteen rajoitukset kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksessä

- ▶ *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- ▶ Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksessä saatuja tuloksia on käytettävä ja tulkittava ottaen huomioon täydellinen kliininen arviointi.
- ▶ Määritys on suunniteltu tunnistamaan tietty CFTR-geenin tunnettujen varianttien alijoukko, mutta se ei sisällä kaikkia CFTR-geenin tunnistettuja variantteja. Erikseen huomautetaan, että määrityksessä raportoidaan aminohappotason muutoksista vain, jos ne liittyvät nukleotidimuutoksiin, jotka **Taulukko 2** luettelee. Vaikka muut nukleotiditason muutokset voivat johtaa samaan aminohappotason muutokseen, määritys ei raportoi niitä. Siten jos varianttia ei ole tunnistettu, se ei takaa, että muita CFTR-variantteja ei ole analysoitavissa näytteissä.
- ▶ Tämän määrityksen tunnistamien varianttien yleisyys voi vaihdella eri väestöissä.
- ▶ Kuten minkä tahansa hybridisaatiopohjaisen määrityksen yhteydessä, piilevät polymorfismit oligonukleotideja sitovilla alueilla saattavat vaikuttaa tutkittaviin alleeleihin ja sekvensoinnin aikana tehtyihin tunnistuksiin.
- ▶ Määritys ei voi määrittää, onko PolyTG-/PolyT-variantin suuntaus cis- vai trans-puolella suhteessa R117H-varianttiin. R117H-variantin omaaville potilaille on tehtävä lisätastaus, jolla määritetään, onko PolyTG-/PolyT-variantti, joka voi vaikuttaa kliiniseen fenotyyppiin (esim. 12-13(TG) tai 5T), cis- vai trans-suuntauksessa suhteessa R117H-varianttiin.



- ▶ PolyTG/PolyT ovat homopolymeerisiä alueita, joiden tiedetään olevan vaikeasti tulkittavia sekvenssipohjaisilla määrityksillä polymeerasiohituksen vuoksi. PolyTG-/PolyT- tuloksissa havaittiin 0,9 %:n (4/448) virheellinen tunnistus, mikä osoitti  $\pm 1$  TG: n eron verrattuna Sangerin kaksisuuntaiseen sekvenssaatioon, katso [Taulukko 16](#).

## Toimenpiteen rajoitukset kystisen fibroosin kliinisessä sekvensointimäärityksessä

- ▶ *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- ▶ Kystisen fibroosin kliinisessä sekvensointimäärityksessä saatuja tuloksia on käytettävä ja tulkittava ottaen huomioon täydellinen kliininen arviointi.
- ▶ Määritys sekvensoi seuraavat CFTR-geenin alueet:
  - ▶ Kaikki CFTR-geenin proteiinikoodausalueet 27 eksonilla.
  - ▶ 5–10 emästä vierekkäisessä intronisessa sekvenssissä.
  - ▶ 100 nukleotidia intronisessa sekvenssissä kohtien 5' ja 3' kääntämättömillä alueilla.
  - ▶ Kaksi syvää intronimutaatiota (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T).
  - ▶ PolyTG-/PolyT-sekvenssi, joka sijaitsee intronissa 9.
  - ▶ Yhteensä 5 206 paikkaa/aluetta geenin 188 702 mahdollisista emäspareista.
- ▶ Määritys on suunniteltu sekvensoimaan proteiinikoodausalueita ja CFTR-geenin introni-/eksonirajoja, eikä se sisällä kaikkia intronisia alueita ja suuria deleetioita. Näin ollen luonnonvaraisen tyypin kokonaistulos ei takaa sitä, että analysoitavien näytteiden sisällä ei ole muita kystisen fibroosin transmembraanijohtumisen säätelijän (CFTR) mutaatioita/variantteja.
  - ▶ Määritys on suunniteltu havaitsemaan kaksi spesifiä suurta deleetiota: CFTRdele2,3 ja CFTRdele22,23. Määritys ei tunnista tai raportoi muita suuria deleetioita. Tämä määritys on validoitu vain enintään 3 bp:n kokoisille lisäyksille ja deleetioille.
- ▶ Kaikki lisäykset/deleetiot on kohdistettu homopolymeerisille alueille sen sijaan, että ne kohdistettaisiin oikealle HGVS-ohjeistuksen mukaisesti. Esimerkiksi variantti c.313delA (sekvenssikontekstilla GAATC) tunnistetaan G-ATC-deleetioksi, mutta deleetio raportoidaan dbSNP:ssä GA-TC-deleetiona. Poikkeuksena tästä ovat CFTR2:ssa tauteja aiheuttaviksi luetellut 135 KF-varianttia (perustuu varianttitietokannan versioon 04/10/2012). Tämän joukon kaikkien homopolymeerialueiden indelien on raportoitu vastaavan CFTR2:n mukaista odotettua varianttiraportointia.<sup>13</sup>
- ▶ Määrityksellä on rajoitus havaita deleetioita tietyissä genomikohdissa sekvensoiduilla alueilla. [Taulukko 4](#) luettelee genomikoordinaatit, joista määritys ei voi ilmoittaa deleetioita. Määritys ei tunnista deleetioita, jotka sisältävät rajoitussarakkeessa mainitun emäksen tai emäkset.

Taulukko 4 Genomikoordinaatit, joissa deleetioita ei voida havaita

CFTR-geenialue	hg19-genomikoordinaatit (chr7)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697

CFTR-geenialue	hg19-genomikoordinaatit (chr7)
CFTR_Exon12	117227802
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

\* Vain deleetioita, jotka sisältävät molemmat tässä luetellut emäkset, ei voida tunnistaa. Esimerkiksi eksoni 8:ssa ei voida havaita  $\geq 2$  bp:n deleetioita, jotka sisältävät emäkset sekä genomikoordinaatissa 117180176 että 117180177. Yhden emäksen deleetio kohdassa 117180176 tai 117180177 voidaan havaita.

- ▶ Jos asiaan liittyvä koordinaatti, jonka **Taulukko 4** esittää, on homopolymeerisen alueen vasemmanpuoleisin emäs, deleetiota mistä tahansa muusta homopolymeerisen jonon paikasta ei voida havaita, koska sitä ei voida erottaa kyseisen koordinaatin deleetiosta.
- ▶ Määritys ei havaitse yhteensä viittä clinVar-kliinisessä tietokannassa (tietokantaversio: joulukuu 2014) lueteltua varianttia. **Taulukko 5** esittää nämä viisi spesifiä varianttia. Tämä määrittäjärajoitus ei vaikuta kystisen fibroosin cftr2-tietokannassa (tietokannan versio 04/10/2012) lueteltuihin variantteihin. Mistään variantista ei ollut saatavilla frekvenssitietoja.

Taulukko 5 Tunnetut variantit, joita kystisen fibroosin kliininen sekvenssimääritys ei havaitse

Variantin numero	ClinVar ID	CFTR-geenialue	Sijainti genomissa (chr 7)	cDNA Name (HGVS) (cDNA-nimi (HGVS))	Protein Name (HGVS) (Proteiinin nimi (HGVS))	rs ID
1	RCV000046424	CFTR_Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

\* Näissä tapauksissa asiaan liittyvät koordinaatit kuuluvat homopolymeerialueelle.

- ▶ Tämän määrityksen tunnistamien varianttien yleisyys voi vaihdella eri väestöissä. Ei ole mahdollista validoida kaikkia varianttiryhmiä, jotka voidaan havaita CFTR-geenissä tällä määrityksellä. On suositeltavaa, että käyttäjä vahvistaa uudet ja harvinaiset variantit validoidulla vertailumenetelmällä.
- ▶ Kuten minkä tahansa hybridisaatiopohjaisen määrityksen yhteydessä, piilevät polymorfismit, mutaatiot, lisäykset tai deleetiot oligonukleotideja sitovilla alueilla saattavat vaikuttaa tutkittaviin alleeleihin ja sekvensoinnin aikana tehtyihin tunnistuksiin.

- ▶ Monimutkaisissa varianteissa, joissa deleetio ja lisäys tapahtuvat samassa paikassa, määrittäminen voi ilmoittaa sen kahdeksi erilliseksi variantiksi, jotka ovat lähellä toisiaan. Varianttien vaihteistusta ei arvioida, ja muita mahdollisia ratkaisuja havaittuun sekvenssiin on harkittava. **Taulukko 6** esittää esimerkin tämänkaltaisesta monimutkaisesta variantista.

Taulukko 6 Esimerkki monimutkaisesta variantista

Sekvenssin konteksti (viite)	GAAGAAATT
Variantin havaittu sekvenssi	GAAT -- ATT
Odotettu variantti	GAA:n deleetio, T:n lisääminen (molemmat muutokset samassa kromosomissa)
Määrittämissä raportoima(t) variantti/variantit	SNP (G>T); AA:n deleetio

- ▶ Jos näytteestä tunnistetaan useampi kuin kaksi varianttia, on suositeltavaa, että käyttäjä tarkistaa tuloksen toistamalla näytteen käyttämällä MiSeqDx-laitetta tuoreella gDNA-ututeella, jotta voidaan sulkea pois näytteen ristikontaminaation mahdollisuus.

**HUOMAUTUS**

Haploryhmän tyyppien vaihteistusta on harkittava, kun havaitaan kaksi tai useampia varianteja. Tällä määrittämisellä ei voida määrittää, ovatko variantit cis-/trans-suuntauksessa muihin varianteihin nähden.

- ▶ Määrittäminen ei voi määrittää, onko PolyTG-/PolyT-variantin suuntaus cis- vai trans-puolella suhteessa muihin varianteihin. R117H-variantin omaaville potilaille on tehtävä lisätestaus, jolla määritetään, onko PolyTG-/PolyT-variantti, joka voi vaikuttaa kliiniseen fenotyyppiin (esimerkiksi 12-13(TG) tai 5T), cis- vai trans-puolella. PolyTG/PolyT ovat homopolymeerisiä alueita, joiden tiedetään olevan vaikeasti sekvensoitavissa polymeerasiohituksen vuoksi.

## Tuotteen osat

TruSight-kystisen fibroosin sarja koostuu seuraavista komponenteista:

- ▶ TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelupaketti (luettelonumero 20036925)

## Mukana tulevat reagenssit

TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelun reagenssit toimittaa Illumina. Sarja on määritetty 1–4 käyttökerralle, enintään 96 näytettä/sarja.

## TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelulaatikko 1

Laatikon 1 reagenssit lähetetään jäädytettynä ja ne ovat stabiileja, kun niitä säilytetään lämpötilassa –25...–15 °C. Reagenssit ovat stabiileja enintään 6 jäädytys-/sulatussyklin ajan määritettyyn viimeiseen käyttöpäivään asti.

Taulukko 7 Laatikkoa 1A: monistusta edeltävät reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Kystisen fibroosin oligopooli	1 putki	600 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää <i>CFTR-geeniin</i> kohdistuvia oligonukleotideja.	–25...–15 °C
Hybridisaatiopuskuri	1 putki	4,32 ml	Suoloja ja formamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos	–25...–15 °C

Osa	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Extension-Ligation Mix -sekoite	1 putki	4,8 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA-polymeraasin, DNA-ligaasin ja dNTP:eiden tekijänoikeuksien suojattua sekoitusta.	-25...-15 °C
Index 2 -alukkeet (A501–A508)	1 putki/aluke	192 µl	PCR-alukkeet, joissa on indeksisekvenssit ja sekvensointisovittimet.	-25...-15 °C
Index 1 -alukkeet (A701–A712)	1 putki/aluke	128 µl	PCR-alukkeet, joissa on indeksisekvenssit ja sekvensointisovittimet.	-25...-15 °C
PCR-polymeraasi	1 putki	56 µl	Tekijänoikeuksien suojattu DNA-polymeraasi.	-25...-15 °C
PCR Master Mix -sekoite	1 putki	2,8 ml	Suoloja ja dNTP:itä sisältävä puskuroitu vesiliuos	-25...-15 °C

Taulukko 8 Laatikko 1B: monistuksen jälkeiset reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Kirjaston normalisoinnin laimennin	1 putki	4,6 ml	Suoloja, 2-merkaptotetanolia ja formamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos	-25...-15 °C
Kirjaston laimennuspuskuri	1 putki	4,5 ml	Puskuroitu vesiliuos	-25...-15 °C
Sisäinen PhiX-kontrolli	1 putki	10 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää PhiX-genomi-DNA:ta	-25...-15 °C

## TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelulaatikko 2

Laatikon 2 reagenssit toimitetaan huoneenlämmössä, ja ne ovat stabiileja 15–30 °C:n lämpötilassa säilytettynä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Taulukko 9 Laatikko 2: monistusta edeltävät reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Suodatinlevy	4 levyä	–	Polypropeeninen mikrotitrauslevy, jossa on modifioitu polyeetterisulfonikalvo.	15–30 °C

Taulukko 10 Laatikko 2: monistuksen jälkeiset reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus (ml)	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Eluutiopuskuri	1 putki	4,8	Puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Kirjaston varastointipuskuri	1 putki	3,5	Puskuroitu vesiliuos	15–30 °C

## TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelulaatikko 3

Laatikon 3 reagenssit toimitetaan jäähdytettynä, ja ne ovat stabiileja 2–8 °C:n lämpötilassa säilytettynä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka.

Taulukko 11 Laatikkoa 3A: monistusta edeltävät reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus (ml)	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
Tiukan protokollan pesupuskuri	1 pullo	24	Suoloja, 2-merkaptetaanolia ja formamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos	2-8 °C
Yleiskäyttöinen pesupuskuri	1 putki	4,8	Suoloja sisältävä puskuroitu vesiliuos.	2-8 °C

Taulukko 12 Laatikko 3B: monistuksen jälkeiset reagenssit

Osa	Määrä	Täyttötilavuus (ml)	Aktiiviset ainesosat	Säilytys
PCR-puhdistusrakeet	1 putki	5	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia kuulia ja polyetyleeniglykolia.	2-8 °C
Kirjaston normalisoinnin pesu	2 putkea	4,8	Suoloja, 2-merkaptetaanolia ja formamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos	2-8 °C
Kirjastorakeet	1 putki	1,2	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia kuulia	2-8 °C

## Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

### Monistusta edeltävät reagenssit

- ▶ 10 N NaOH (valmista tableteista tai käytä standardiliuosta)
- ▶ TE-puskuri
- ▶ RNAasiton/DNAasiton vesi

### Monistuksen jälkeiset reagenssit

- ▶ 10 N NaOH (valmista tableteista tai käytä standardiliuosta)
- ▶ Etanoli (EtOH), 200-kelpoinen molekyylibiologiaan
- ▶ TE-puskuri
- ▶ RNAasiton/DNAasiton vesi

### MiSeqDx-reagenssit

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 (luettelonro 20012552 tai 20037124 alueen mukaan) tai MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (luettelonro 20063860)
- ▶ 5-prosenttinen natriumhypokloriitti
- ▶ Tween 20
- ▶ Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi

## Säilytys ja käsittely

- 1 Huoneen lämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.

- 2 Hybridisaatiopuskuri, vaativan pesun puskuri ja kirjaston normalisointiin käytettävät laimennusreagenssit saattavat muodostaa näkyviä saostumia tai kiteitä. Ennen käyttöä vorteksoi voimakkaasti ja tarkista sitten visuaalisesti, ettei näy saostumia.
- 3 Noudata seuraavia alan parhaita käytäntöjä käsitellessäsi PCR:n puhdistusrakeita ja kirjastorakeita:
  - ▶ Rakeet eivät saa koskaan jäättyä.
  - ▶ Anna rakeiden lämmetä huoneenlämpöiseksi.
  - ▶ Vorteksoi eli ravista rakeita juuri ennen käyttöä, kunnes ne ovat hyvin suspendoituneet ja väri vaikuttaa tasaiselta.
  - ▶ Sekoita näyte perusteellisesti, kun rakeet on lisätty, pipetoimalla ylös ja alas 10 kertaa. Ravistinta voidaan käyttää rakeiden perusteelliseen sekoittamiseen.
  - ▶ Inkuboi rae-/näyteseosta huoneenlämmössä koko ilmoitetun ajan.
  - ▶ Noudata ohjeita käytettäessä magneettista jalustaa. Odota, että liuos kirkastuu ennen aspirointia. Pidä levy magneettisella jalustalla, kun aspiroit hitaasti supematanttia. Varo häiritsemästä erillisiä rakeita.
- 4 Älä jäädytä kirjastorakeita tai sekoita kirjaston normalisoinnin laimennusreagenssin kanssa, jos rakeita ei käytetä välittömästi.

## Välineet ja materiaalit

Toimitukseen kuuluvat välineet ja materiaalit, jotka myydään erikseen

- ▶ MiseqDx-laite, luettelonro DX-410-1001
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture Kit, luettelonumero FC-130-1005
- ▶ TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit, luettelonumero FC-130-1007
- ▶ Indeksisivittimen vaihtokorkit, luettelonumero DX-502-1003
- ▶ MiSeq-putki, luettelonumero MS-102-9999

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

### Monistusta edeltävät välineet ja materiaalit

- ▶ **Lämpölohko** – 96-kuoppaiselle levylle tarvitaan yksi lämpölohko. Lämmitetyillä kansilla varustettujen lämpölohkosten käyttö on hyväksyttävää. Aktiivisella jäähdytyksellä toimivien lämpösyklilaitteiden tai lämpölohkosten (esimerkiksi Peltier, jossa lämpösähköinen jäähdytys) käyttöä ei suositella hybridisaatiovaiheeseen. Passiivinen jäähdytysvaihe on kriittisen tärkeä asianmukaisen hybridisoinnin kannalta. Lämpölohkoston on täytettävä seuraavat suorituskykyvaatimukset:
  - ▶ Lämpötila-alue: ympäristön lämpötila +5–99 °C
  - ▶ Lämpötilan säätö: ±0,1 °C lämpötilassa 37 °C; ±0,4 °C lämpötilassa 60 °C
- ▶ **Näyteinkubaattori** – Tarvitaan yksi inkubaattori (hybridisaatiouuni). Inkubaattorin on täytettävä seuraavat suorituskykyvaatimukset:
  - ▶ Lämpötila-alue: 10–100 °C
  - ▶ Lämpötilan säätö: ±0,2 °C
- ▶ **Pöytäseentrifugi** – Tarvitaan yksi lämpötilasäädeltä pöytäseentrifugi, joka pystyy ylläpitämään 20 °C:n lämpötilan. Monistuksen jälkeisellä alueella tarvitaan erillinen seentrifugi. Mikä tahansa levysentrifugi, johon mahtuu 96-kuoppainen levy suodatinyksiköllä ja joka saavuttaa protokollalle määritetyt nopeudet (280–2 400 × g), on hyväksyttävä.
- ▶ **Tarkkuuspipetit** – Tarvitaan yksi tarkkuuspipettisarja. Monistuksen jälkeisellä alueella tarvitaan erillinen sarja. Tarkkuuspipettien käyttö on tarpeen reagenssien ja näytteiden tarkan toimittamisen varmistamiseksi. Yksikanavaisia tai monikanavaisia pipettejä voidaan käyttää, jos ne kalibroidaan säännöllisesti, ja ne ovat tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.

- ▶ **Tarvikkeet** – Seuraavat tarvikkeet tarvitaan:
  - ▶ 96-kuoppaiset "skirted"-tyypin PCR-levyt, 0,2 ml, polypropeeni tai vastaava
  - ▶ 96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)
  - ▶ Liuosallas, PVC, DNAasiton ja RNAasiton (kourumalli)
  - ▶ Liimapintainen alumiinifoliosulkukansi
  - ▶ Sopiva PCR-levyn sulkukansi
  - ▶ Aerosolinkestävät pipettikärjet
  - ▶ Kartiomaiset putket, 15 ml

## Monistuksen jälkeiset välineet ja materiaalit

- ▶ **Lämpösyklilaite** – Yksi lämpösyklilaite vaaditaan. Lämpösyklilaitteessa on oltava lämmitetty kansi, ja sen on täytettävä seuraavat suorituskykyvaatimukset:
  - ▶ Lämpötilan säätöalue: 4–99 °C
  - ▶ Säätötarkkuus: ±0,25 °C lämpötilavälillä 35–99 °C
- ▶ **Mikrolevyravistin** – Monistuksen jälkeisellä laboratorion työalueella tarvitaan yksi mikrolevyravistin. Levyravistimen on täytettävä seuraavat suorituskykyvaatimukset:
  - ▶ Suurin sekoitusnopeus: 3 000 kierr./min
  - ▶ Sekoitusnopeusalue: 200–3 000 kierr./min
- ▶ **Pöytäseentrifugi** – Tarvitaan yksi pöytäseentrifugi, joka pystyy ylläpitämään 20 °C:n lämpötilan. Monistusta edeltävällä alueella tarvitaan erillinen seentrifugi. Mikä tahansa levysesentrifugi, joka saavuttaa protokollalle määritetyt nopeudet (280–2 400 × g), on hyväksyttävä.
- ▶ **Lämpölohko** – Putkille tarvitaan yksi lämpölohko. Lämpölohkon on täytettävä seuraavat suorituskykyvaatimukset:
  - ▶ Lämpötila-alue: ympäristön lämpötila +5–99 °C
  - ▶ Lämpötilan säätö: ±0,1 °C lämpötilassa 37 °C; ±0,4 °C lämpötilassa 60 °C
- ▶ **Magneettinen jalusta** – Tarvitaan yksi magneettinen jalusta 96-kuoppaiselle levylle. Suorituskyky on parempi, kun magneetit ovat jalustan sivuilla eivätkä pohjassa.
- ▶ **Tarkkuuspipetit** – Tarvitaan yksi tarkkuuspipettisarja. Monistusta edeltävällä alueella tarvitaan erillinen sarja. Tarkkuuspipettien käyttö on tarpeen reagenssien ja näytteiden tarkan toimittamisen varmistamiseksi. Yksikanavaisia tai monikanavaisia pipettejä voidaan käyttää, jos ne kalibroidaan säännöllisesti, ja ne ovat tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.
- ▶ **Pöytäseentrifugi** – Tarvitaan lämpötilasäädeltävä seentrifugi, joka pystyy ylläpitämään 20 °C:n lämpötilan ja joka hyväksyy mikrosentrifugiputket. Mikä tahansa seentrifugi, joka saavuttaa protokollalle määritetyt nopeudet (280–1 000 × g), on hyväksyttävä.
- ▶ **Tarvikkeet** – Seuraavat tarvikkeet tarvitaan:
  - ▶ 96-kuoppaiset "skirted"-tyypin PCR-levyt, 0,2 ml, polypropeeni tai vastaava
  - ▶ 96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)



### HUOMAUTUS

Varmista, että 96-kuoppainen levy on yhteensopiva magneettisen jalustan kanssa.

- ▶ Kartiomaiset putket, 15 ml ja 50 ml
- ▶ Mikrosentrifugiputket (ruuvikorkkia suositellaan)
- ▶ Kahdeksan PCR-putken rivit
- ▶ Liuosaltat, PVC, DNAasiton ja RNAasiton (kourumalli)
- ▶ Liimapintaiset alumiinifoliosulkukannet
- ▶ Liimapintaiset kertakäyttöiset levyn sulkukannet
- ▶ Aerosolinkestävät pipettikärjet

## Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen



### HUOMAUTUS

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.

- ▶ K<sub>2</sub>EDTA-putkiin otettuja kokoverinäytteitä voidaan käyttää.
- ▶ Kokoverinäytteitä voidaan säilyttää enintään 7 päivää huoneenlämmössä ja enintään 30 päivää 2–8 °C:ssa tai enintään 30 päivää, jos ne jäädytetään lämpötilaan –25...–15 °C.
- ▶ Kuljeta kokoverinäytteitä enintään 7 päivää huoneenlämmössä ja enintään 30 päivää 2–8 °C:ssa tai enintään 30 päivää, jos ne jäädytetään lämpötilaan –25...–15 °C. Kokoveren kuljetuksessa on noudatettava kaikkia maakohtaisia, osavaltiokohtaisia ja paikallisia sovellettavia säädöksiä etiologisten aineiden kuljetuksesta.
- ▶ Haitallista vaikutusta määritystuloksiin ei havaittu, kun genomi-DNA:lle tehtiin 6 jäätymis-/sulamissykliä.
- ▶ Määritystuloksissa ei havaittu haitallisia vaikutuksia kokoverinäytteillä, joiden bilirubiini-, kolesteroli-, triglyseridi-, EDTA- tai hemoglobiiniarvot olivat nousseet.

## Varoitukset ja varotoimet



### HUOMIO

USA:n liittovaltion laki rajoittaa tämän laitteen myyntiä niin, että sen saa myydä vain lääkäri tai muu terveydenhoidon ammattilainen, jolla on kyseisen osavaltion luvat ammatin harjoittamiseen. Sama koskee laitteen käyttöä tai sen määräämistä käyttöön.



### VAROITUS

**Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Katso lisätietoja kohdasta *Mukana tulevat reagenssit sivulla 11.*)**

- ▶ Jotkin tämän määrityksen komponentit sisältävät 2-merkaptetaanolia, joka on pelkistävä aine. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä hyvin tuuletetulla alueella ja hävitä säiliöt ja käyttämätön sisältö sovellettavien paikallisten turvallisuusstandardien mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Katso lisätietoja kohdasta *Mukana tulevat reagenssit sivulla 11.*)
- ▶ Jotkin tämän määrityksen komponentit sisältävät formamidia eli alfaattista amidia, joka on todennäköinen lisääntymistoksiini. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne alueesi turvallisuusstandardien mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html). (Katso lisätietoja kohdasta *Mukana tulevat reagenssit sivulla 11.*)
- ▶ Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista tapahtumista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaiselle viranomaiselle siinä jäsenvaltiossa, jossa käyttäjä ja/tai potilas on kirjoilla.
- ▶ Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.
- ▶ Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voi olla virheellisiä tuloksia tai näytteiden laadun merkittävä heikentyminen.



- ▶ Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai määritysreagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja koereagenssien käsittelyn jälkeen.
- ▶ Määrityksen komponentteja ei saa käyttää määrityspakkauksen etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen. Eri määrityserien komponentteja ei saa vaihtaa keskenään. Määrityserä on ilmoitettu määrityspakkauksen etiketissä.
- ▶ Näytteen tai reagenssin huononemisen estämiseksi on varmistettava, että natriumhypokloriittihöyryt ovat haihtuneet täysin ennen protokollan aloittamista.
- ▶ On noudatettava asianmukaisia laboratoriotyön käytänteitä ja hyvää laboratoriotyön hygieniää, jotta reagenssit, instrumentit ja DNA-genominäytteet eivät kontaminoituisi. PCR-kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- ▶ Toimitettujen reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos ilmenee fyysisen ulkoasun muutoksia, kuten reagenssin värin ilmiselviä muutoksia tai mikrobikontaminaatiolle ominaista sakkaisuutta, älä käytä reagensseja.
- ▶ Jotta kontaminoituminen voidaan välttää, varmista, että monistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueet on eriytetty fyysisesti ja niillä on omat laitteet ja varusteet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, vorteksointilaitte ja sentrifugi).
- ▶ Vältä ristikontaminaatiota. Käytä uusia pipettikärkiä näytteiden välillä ja reagenssien lisäämisen välillä. Sekoita näytteet pipetillä ja sentrifugoi levy, kun se on indikoitua. Älä vorteksoi levyjä. Aerosoliresistenttien kärkien käyttö vähentää amplikonin siirtymisen ja näytteiden välisen ristikontaminaation riskiä.
- ▶ Indeksi-näyte-pariliitoksen on vastattava MiSeqDx-ajoa varten annettuja näytetietoja. Levyn asettelun ja näytteen väliset yhteensopimattomuudet johtavat positiivisen näytteen tunnistuksen menetykseen ja virheellisen tuloksen raportointiin.
- ▶ Valmista aina tuore 80 %:n etanoliliuos pesuvaiheita varten. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä vaikuttaa tuloksiin.
- ▶ Varmista etanolin haihtuminen kokonaan noudattamalla magneettisen jalustan vaihetta seuraavaa kuivausaikaa. Etanolin jäämät voivat vaikuttaa myöhempien reaktioiden toimintaan.
- ▶ Säilytä määrityskomponentit määrättyssä lämpötilassa määrättyillä esimonistus- ja jälkimonistusalueilla.
- ▶ Laatikon 1 komponenttien toistuvat jäädytys-sulatusjaksot (enintään 6) eivät vaaranna määrityksen toimintaa.
- ▶ Älä sekoita kystisen fibroosin oligopoolia ja hybridisaatiopuskuria säilytystä varten. Kombinoituna kystisen fibroosin oligopooli muuttuu epävakaaksi, vaikka se varastoitaisiin pakastettuna.
- ▶ Aktiivisella jäädytyksellä toimivien lämpösyklilaitteiden (esimerkiksi Peltier, jossa lämpösähköinen jäädytys) käyttöä ei suositella hybridisaatiovaiheeseen. Passiivinen jäädytysvaihe on kriittisen tärkeä asianmukaisen hybridisoinnin kannalta.
- ▶ Lisää PCR-polymeraasi PCR Master Mix -sekoitteeseen aina juuri ennen käyttöä. Älä koskaan säilytä yhdistettyä master mix -sekoitetta.
- ▶ Kirjaston normalisointivaiheen aikana on kriittisen tärkeää suspendoida kirjastoraie kokonaan uudelleen. Tämä on välttämätöntä, jotta saavutetaan MiSeqDx-laitteen virtauskyvetin tasainen klusteritiheys.
- ▶ Noudata kirjaston normalisointivaiheelle määritettyjä inkubointiaikoja. Virheellinen inkubointi voi vaikuttaa kirjaston edustavuuteen ja klusterin tiheyteen.
- ▶ Levysierojen määrän ja kontaminaatiopotentiaalin vuoksi ole erittäin huolellinen, jotta sisältö pysyy kokonaan kuopassa. Älä läikytä sisältöä.
- ▶ 250 ng:n DNA-lisäyssi suositella mahdollistaa DNA-määrän vaihtelun. Määrityksen toimintaa ohjaa tämä lisäystaso.
- ▶ Näytevariantit, joiden testiraportissa on No Call (Ei tunnistusta) -merkintä, osoittavat, että varianttisijaintia koskevat tiedot eivät täyttäneet määritettyjä sekvensoinnin kynnysarvoja. Älä ilmoita varianteja, joilla on No Call (Ei tunnistusta) -merkintä, ellei toistuva testaus tuota arvoja, jotka täyttävät määritetyt kynnysarvot ja joilla ei enää ole No Call (Ei tunnistusta) -merkintää.

## Lyhenteet

Taulukko 13 TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelun akronyymit

Lyhenne	Määritelmä
AMP	AMplification Plate eli monistuslevy
CLP	CLean-up Plate eli puhdistuslevy
DAL	Diluted Amplicon Library eli laimennettu amplikonikirjasto
FPU	Filter Plate Unit eli suodatinlevy-yksikkö
HYB	HYBridization Plate eli hybridisaatiolevy
LNP	Library Normalization Plate eli kirjaston normalisoinnin levy
NTC	No Template Control eli kontrolli ilman mallia
PAL	Pooled Amplicon Library eli poolattu amplikonikirjasto
SGP	StoraGe Plate eli varastointilevy

## Muut apumateriaalit

Illuminan verkkosivujen TruSight-kystisen fibroosin tukisivuilla on ohjelmistoja, koulutusresursseja, tuotteiden yhteensopivuustietoja ja seuraavat asiakirjat. Katso aina asiakirjojen uusimmat versiot tukisivuilta.

Materiaali	Kuvaus
<i>Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module -analyysimoduulin työnkuluopas (asiakirjanumero 1000000100945)</i>	Sisältää ohjeet ajoparametrien määrittämiseksi CF 139-Variant 2.0 Analysis Module -analyysimoduulin avulla tapahtuvaa sekvensointia ja analysointia varten.
<i>Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module -analyysimoduulin työnkuluopas (asiakirjanumero 1000000100946)</i>	Sisältää ohjeet ajoparametrien määrittämiseksi CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module -analyysimoduulin avulla tapahtuvaa sekvensointia ja analysointia varten.
<i>Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin työnkuluopas (asiakirjanumero 200017946)</i>	Sisältää ohjeet ajoparametrien määrittämiseksi CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin avulla tapahtuvaa sekvensointia ja analysointia varten.
<i>Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin työnkuluopas (asiakirjanumero 200017945)</i>	Sisältää ohjeet ajoparametrien määrittämiseksi CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin avulla tapahtuvaa sekvensointia ja analysointia varten.
<i>Local Run Manager -ohjelmiston viiteopas MiSeqDx-järjestelmälle (asiakirjanro 1000000011880)</i>	Sisältää ohjeet ajon luomiseen, tilan valvontaan, sekvensointitietojen analysointiin ja tulosten tarkastelemiseen MiSeqDx-laitteessa.
<i>MiSeqDx-laitteen viiteopas MOS v2:lle (asiakirjanro 1000000021961)</i>	Sisältää ohjeet ajojen määrittämiseen ja sekvensointiin, mukaan lukien MiSeqDx-laitteen huoltotoimenpiteet.

## Toimenpidehuomautukset

- ▶ Illumina edellyttää, että jokaiseen ajoon sisältyy yksi positiivinen kontrolli-DNA-näyte ja negatiivinen kontrolli (NTC tai "No Template Control"), joka määritellään rinnakkain käsiteltäviksi näytteiksi. Positiivisen kontrolli-DNA-näytteen on oltava hyvin määritetty näyte, jossa on yksi tai useampi tunnettu CFTR-variantti. Illumina suosittelee luonnonvaraisen tyypin kontrollin käyttöä. Luonnonvaraisen tyypin kontrolli on ajettava näytteenä, eikä se saa korvata positiivista tai negatiivista kontrollia.
- ▶ Säilytä määrityskomponentit määrättyssä lämpötilassa määrättyillä esimonistus- ja jälkimonistusalueilla.
- ▶ Laatikon 1 komponenttien toistuvat jäädytys-sulatusjaksot (enintään 6) eivät vaaranna määrityksen toimintaa.

## Näytteiden valmistelu

Ennen kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen tai kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen aloittamista, eristä ja kvantifioi DNA kokoverestä.

- ▶ Mitä tahansa validoitua DNA:n eristämismenetelmää voidaan käyttää.
- ▶ Kvantifioi DNA spektrofotometrillä. Varmista, että DNA-näytteen A260/A280 on > 1,5. Normalisoi DNA-näyte arvoon 50 ng/µl. Jokainen näyte vaatii 5 µl genomi-DNA:ta (yhteensä 250 ng).

## Näytekäsittelynopeus

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen näytekäsittelynopeus voi olla 24–96 näytettä MiSeqDx Reagent Kit v3:n tapauksessa ja 24–36 näytettä MiSeqDx Reagent Kit v3 Micron tapauksessa. PCR-monistuksen aikana käytettävät indeksointipraimerit on valittava halutun lopullisen näytekäsittelynopeuden perusteella, jotta jokainen kirjasto käyttää yksilöllistä indeksiyhdistelmää.



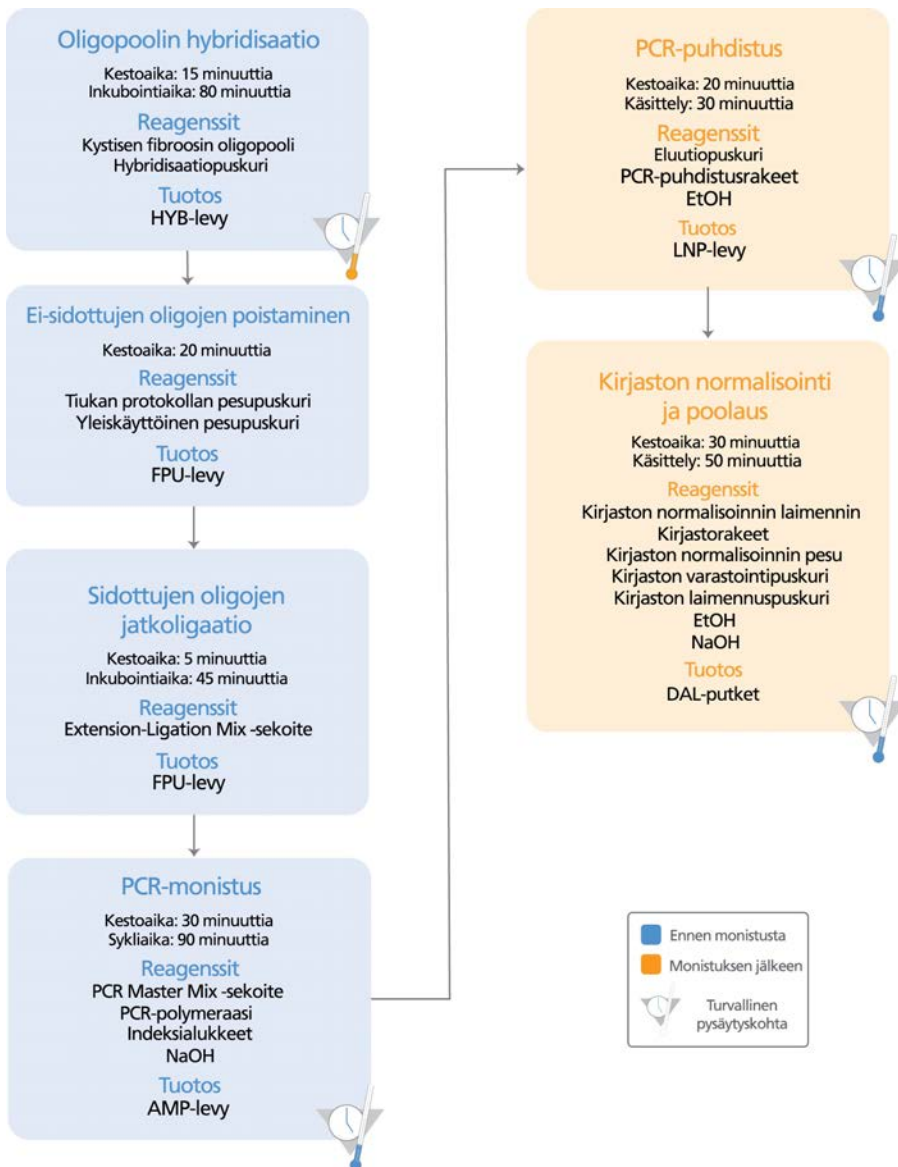
### HUOMAUTUS

Illumina ei vahvista toimintaa, jos jatkat, kun näytteitä on määritetty alle 24.

## Kirjaston valmistelun työnkulku

Seuraavassa kaaviossa kuvataan kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen kirjaston valmistelun työnkulku. Monistusta edeltävät vaiheet: oligopoolien hybridisointi, sitomattomien oligojen poisto ja sidottujen oligojen jatkeligaatio. PCR-monistusvaihetta varten PCR-levyn asennus tapahtuu esimonistustusalueella, kun taas termosyklilaitteen PCR tapahtuu monistuksen jälkeisellä alueella. Monistuksen jälkeiset vaiheet sisältävät: PCR-puhdistus sekä kirjaston normalisointi ja poolaus. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Kuva 1 Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen kirjaston valmistelun työnkulku



## Käyttöohjeet

TruSight-kystisen fibroosin kirjaston valmistelu tukee kahta määrittystä, kystisen fibroosin 139-varianttimääritystä ja kystisen fibroosin kliinistä sekvenssimääritystä. TruSight-kystisen fibroosin työnkulku sisältää määrittämissä, kirjaston valmistelun, sekvenssin ja ajon jälkeisen pesun. Määrittämissä valintaa lukuun ottamatta kaikki menettelyvaiheet ovat samat molemmissä määrittämissä.

## Määrittämissä valinta ja ajon valmistelu

- ▶ Jos käytät kystisen fibroosin 139-varianttimääritystä, katso kohta *Local Run Manager CF-139 Variant 2.0 -analyysimoduulin käyttäminen* sivulla 21.

- ▶ Voit katsoa tästä osiosta myös Local Run Manager CF-139 Variant 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin käyttöä koskevat ohjeet. Muista valita tässä tapauksessa ajon luomisen yhteydessä **CF 139-Variant 2.0 Micro** CF 139-Variant 2.0:n sijasta.
- ▶ Jos käytät kystisen fibroosin kliinistä sekvensointimääritystä, katso *Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 -analyysimoduulin käyttäminen* sivulla 22.
- ▶ Voit katsoa tästä osiosta myös Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module -analyysimoduulin käyttöä koskevat ohjeet. Muista valita tässä tapauksessa ajon luomisen yhteydessä **CF Clinical Seq 2.0 Micro** CF Clinical Seq 2.0:n sijasta.

## Local Run Manager CF-139 Variant 2.0 -analyysimoduulin käyttäminen

### Parametrien määrittäminen

- 1 Kirjautu sisään Local Run Manageriin.
- 2 Valitse **Create Run** (Luo ajo) ja valitse sitten **CF 139-Variant 2.0**.
- 3 Anna ajon nimi, jonka perusteella ajo tunnustetaan sekvensoinnin ja analyysin aikana. Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja (enintään 40 merkkiä).
- 4 **[Valinnainen]** Anna ajon kuvaus. Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja (enintään 150 merkkiä).
- 5 Anna kirjaston valmisteluserjan eränumero ja vanhentumispäivä.

### Näytteiden määrittäminen ajoa varten

Määritä näytteet ajoa varten käyttämällä jompaakumpaa seuraavista vaihtoehdoista.

- ▶ **Enter Samples Manually** (Syötä näytteet manuaalisesti) – Käytä Create Run (Luo ajo) -näytön tyhjää taulukkoa. Ehdotetut näytekupat näkyvät korostettuina.
- ▶ **Import Samples** (Tuo näytteet) – Siirry ulkoiseen tiedostoon, jossa arvot on erotettu toisistaan pilkulla (\*.csv). Create Run (Luo ajo) -näytössä on saatavilla ladattava malli.

### Näytteiden syöttäminen manuaalisesti

- 1 Syötä ainutkertainen näytenimi Sample Name (Näytenimi) -kenttään. Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, väliviivoja tai alaviivoja (enintään 40 merkkiä).
- 2 Napsauta hiiren kakkospainiketta ja valitse positiivisia ja negatiivisia kontrollinäytteitä. Ajon tallentaminen edellyttää vähintään yhden positiivisen ja yhden negatiivisen kontrollinäytteen valitsemista.
- 3 **[Valinnainen]** Syötä näytekuvauksen näytteen Description (Kuvaus) -välilehteen. Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, väliviivoja tai alaviivoja (enintään 50 merkkiä).
- 4 **[Valinnainen]** Valitse indeksin 1 sovitin avattavasta Index 1 (i7) (Indeksi 1 (i7)) -luettelosta. Tämä vaihe on valinnainen, koska i7- ja i5-indeksiyhdistelmät määritetään oletusasettelussa automaattisesti.
- 5 **[Valinnainen]** Valitse indeksin 2 sovitin avattavasta Index 2 (i5) (Indeksi 2 (i5)) -luettelosta. Tämä vaihe on valinnainen, koska i7- ja i5-indeksiyhdistelmät määritetään oletusasettelussa automaattisesti.
- 6 Tuo näyttöön levyasettelu valitsemalla **Print** (Tulosta) -kuvake.
- 7 Valitse **Print** (Tulosta) levyasettelun tulostamiseksi viitteeksi kirjastojen valmistelua varten.
- 8 **[Valinnainen]** Valitsemalla **Export** (Vie) voit viedä näytetietotiedoston.
- 9 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo). Jos olet määrittänyt alle 24 näytettä, näkyviin tulee Insufficient Sample (Riittämätön näyte) -ikkuna. Jatka valitsemalla **Proceed** (Jatka) tai muokkaa näytteitä valitsemalla **Cancel** (Peruuta).



### HUOMIO

Illumina ei ole validoinut sekvensointia alle 24 näytettä sisältävillä poolatuilla kirjastoilla.

#### Näytteiden tuonti

Näytteet voidaan tuoda kahdentyyppisistä tiedostoista:

- ▶ Näytetietotiedostosta, joka on viety aiemmin CF 139-Variant 2.0 -moduulista Export (Vienti) -ominaisuuden avulla.
- ▶ Mallitiedostosta, joka voidaan luoda valitsemalla Create Run (Luo ajo) -näytössä **Template** (Malli). Mallitiedosto sisältää tuontia varten tarvittavat oikeat sarakeotsikot, ja kukin sarake sisältää paikkamerkkiedot. Voit mukauttaa mallitiedostoa käyttämällä ulkoista editoria:
  - 1 Lisää ajon kunkin näytteen näytetiedot.
  - 2 Kun kaikki näytetiedot on lisätty, poista paikkamerkkiedot käyttämättömistä soluista.
  - 3 Tallenna mallitiedosto.

Voit tuoda näytetiedot seuraavasti:

- 1 Valitse **Import Samples** (Tuo näytteet) ja etsi sitten tiedosto selaamalla ja valitse se.
- 2 Tuo näyttöön levyasettelu valitsemalla **Print** (Tulosta) -kuvake.
- 3 Valitse **Print** (Tulosta) levyasettelun tulostamiseksi viitteeksi kirjastojen valmistelua varten.
- 4 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).  
Jos olet määrittänyt alle 24 näytettä, näkyviin tulee Insufficient Sample (Riittämätön näyte) -ikkuna. Jatka valitsemalla **Proceed** (Jatka) tai muokkaa näytteitä valitsemalla **Cancel** (Peruuta).



#### HUOMIO

Illumina ei ole validoinut sekvensointia alle 24 näytettä sisältävillä poolatuilla kirjastoilla.

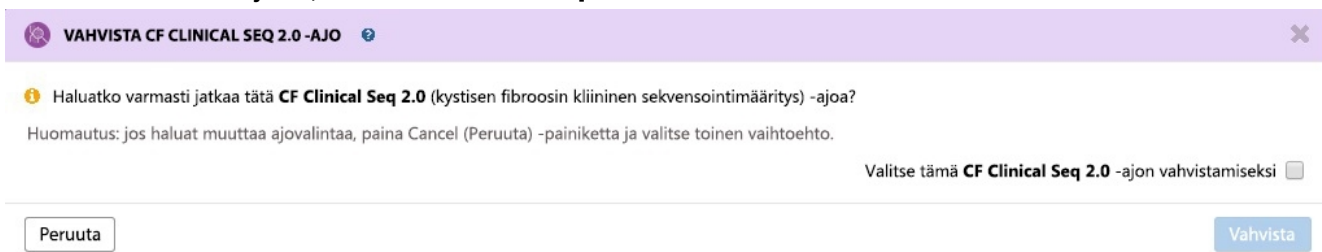
#### Ajon muokkaaminen

Katso ennen sekvensointia tapahtuvaa ajon tietojen muokkausta koskevat ohjeet asiakirjasta *Local Run Manager -ohjelmiston viiteopas MiSeqDx-järjestelmälle (asiakirjanro 1000000011880)*.

### Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 -analyysimoduulin käyttäminen

#### Parametrien määrittäminen

- 1 Kirjautu sisään Local Run Manageriin.
- 2 Valitse **Create Run** (Luo ajo) ja valitse sitten **CF Clinical Seq 2.0**.  
Ponnahdusikkuna näyttää, että **CF Clinical Seq 2.0** on tarkoitettu valinta.



- 3 Jatka valitsemalla valintaruutu ja valitse **Confirm** (Vahvista) (tai valitse **Cancel** (Peruuta) palataksesi päänäyttöön).
- 4 Anna ajon nimi, jonka perusteella ajo tunnustetaan sekvensoinnin ja analyysin aikana.  
Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja (enintään 40 merkkiä).
- 5 **[Valinnainen]** Anna ajon kuvaus.  
Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja (enintään 150 merkkiä).
- 6 Anna kirjaston valmisteluserjan eränumero ja vanhentumispäivä.

#### Näytteiden määrittäminen ajoa varten

Määritä näytteet ajoa varten käyttämällä jompaakumpaa seuraavista vaihtoehdoista.

- ▶ **Enter Samples Manually** (Syötä näytteet manuaalisesti) – Käytä Create Run (Luo ajo) -näytön tyhjää taulukkoa. Ehdotetut näytekupat näkyvät korostettuina.
- ▶ **Import Samples** (Tuo näytteet) – Siirry ulkoiseen tiedostoon, jossa arvot on erotettu toisistaan pilkulla (\*.csv). Create Run (Luo ajo) -näytössä on saatavilla ladattava malli.

Näytteiden syöttäminen manuaalisesti

- 1 **Syötä** ainutkertainen näytenimi Sample Name (Näytenimi) -kenttään.  
Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, väliviivoja tai alaviivoja (enintään 40 merkkiä).
- 2 Napsauta hiiren kakkospainiketta ja valitse positiivisia ja negatiivisia kontrollinäytteitä.  
Ajon tallentaminen edellyttää vähintään yhden positiivisen ja yhden negatiivisen kontrollinäytteen valitsemista.
- 3 **[Valinnainen]** Syötä näytekuvauksen näytteen Description (Kuvauksen) -välilehteen.  
Käytä aakkosnumeerisia merkkejä, väliviivoja tai alaviivoja (enintään 50 merkkiä).
- 4 **[Valinnainen]** Valitse indeksin 1 sovittin avattavasta Index 1 (i7) (Indeksi 1 (i7)) -luettelosta.  
Tämä vaihe on valinnainen, koska i7- ja i5-indeksiyhdistelmät määritetään oletusasettelussa automaattisesti.
- 5 **[Valinnainen]** Valitse indeksin 2 sovittin avattavasta Index 2 (i5) (Indeksi 2 (i5)) -luettelosta.  
Tämä vaihe on valinnainen, koska i7- ja i5-indeksiyhdistelmät määritetään oletusasettelussa automaattisesti.
- 6 Tuo näyttöön levyasettelu valitsemalla **Print** (Tulosta) -kuvake.
- 7 Valitse **Print** (Tulosta) levyasettelun tulostamiseksi viitteeksi kirjastojen valmistelua varten.
- 8 **[Valinnainen]** Valitsemalla **Export** (Vie) voit viedä näytetietotiedoston.
- 9 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).  
Jos olet määrittänyt alle 24 näytettä, näkyviin tulee Insufficient Sample (Riittämätön näyte) -ikkuna. Jatka valitsemalla **Proceed** (Jatka) tai muokkaa näytteitä valitsemalla **Cancel** (Peruuta).



#### HUOMIO

Illumina ei ole validoinut sekvensointia alle 24 näytettä sisältävillä poolatuilla kirjastoilla.

Näytteiden tuonti

Näytteet voidaan tuoda kahdentyyppisistä tiedostoista:

- ▶ Näytetietotiedostosta, joka on viety aiemmin CF Clinical Seq 2.0 -moduulista Export (Vienti) -ominaisuuden avulla.
- ▶ Mallitiedostosta, joka voidaan luoda valitsemalla Create Run (Luo ajo) -näytössä **Template** (Malli).  
Mallitiedosto sisältää tuontia varten tarvittavat oikeat sarakeotsikot, ja kukin sarake sisältää paikkamerkkiedot. Voit mukauttaa mallitiedostoa käyttämällä ulkoista editoria:
  - 1 Lisää ajon kunkin näytteen näytetiedot.
  - 2 Kun kaikki näytetiedot on lisätty, poista paikkamerkkiedot käyttämättömistä soluista.
  - 3 Tallenna mallitiedosto.

Voit tuoda näytetiedot seuraavasti:

- 1 Valitse **Import Samples** (Tuo näytteet) ja etsi sitten tiedosto selaamalla ja valitse se.
- 2 Tuo näyttöön levyasettelu valitsemalla **Print** (Tulosta) -kuvake.
- 3 Valitse **Print** (Tulosta) levyasettelun tulostamiseksi viitteeksi kirjastojen valmistelua varten.
- 4 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).  
Jos olet määrittänyt alle 24 näytettä, näkyviin tulee Insufficient Sample (Riittämätön näyte) -ikkuna. Jatka valitsemalla **Proceed** (Jatka) tai muokkaa näytteitä valitsemalla **Cancel** (Peruuta).



#### HUOMIO

Illumina ei ole validoinut sekvensointia alle 24 näytettä sisältävillä poolatuilla kirjastoilla.

Ajon muokkaaminen

Katso ennen sekvensointia tapahtuvaa ajon tietojen muokkausta koskevat ohjeet asiakirjasta *Local Run Manager -ohjelmiston viiteopas MiSeqDx-järjestelmälle (asiakirjanro 100000011880)*.

## Kirjaston valmistelun työ



### HUOMAUTUS

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen kirjaston valmistelun työnkulut ovat identtiset.

## Oligonukleotidipoolin hybridisaatio

### Tarvikkeet

- ▶ 96 kuopan PCR-levy
- ▶ Genomi-DNA (gDNA) -näytteet
- ▶ Hybridisaatiopuskuri
- ▶ Positiivinen kontrollinäyte
- ▶ Kystisen fibroosin oligopooli
- ▶ TE-puskuri
- ▶ Liimapintainen alumiinifoliosulkukansi

Valmisteleminen

#### 1 Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Hybridisaatiopuskuri	-25...-15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti varmistaaksesi, että kaikki saostumat ovat täysin liunneet, ja sentrifugoi sitten putkia hetken nesteen keräämiseksi.
Kystisen fibroosin oligopooli	-25...-15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti varmistaaksesi, että kaikki saostumat ovat täysin liunneet, ja sentrifugoi sitten putkia hetken nesteen keräämiseksi.

- 2 Tuo gDNA-näytteet ja positiivinen kontrollinäyte huoneenlämpöön.
- 3 Aseta 96-kuoppainen lämpölohko 95 °C:n lämpötilaan.
- 4 Esilämmitä inkubaattori 37 °C:n lämpötilaan.

Toimenpide

- 1 Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä HYB.
  - 2 Luo näytelevy Local Run Managerista tulostetun levykuvan mukaan.
  - 3 Lisää Local Run Managerista luodun levyasettelun mukaisesti HYB-levyn asianmukaiseen kuoppaan 5 µl negatiivista kontrollia (esimerkiksi TE-puskuria).
  - 4 Lisää 5 µl näytettä tai kontrollia 50 ng/µl (yhteensä 250 ng) HYB-levyn asianmukaisiin kuoppiin.
  - 5 Lisää 5 µl kystisen fibroosin oligopoolia kuhunkin näytekuoppaan.
  - 6 Lisää 40 µl hybridisaatiopuskuria jokaiseen HYB-levyn näytteeseen.
  - 7 Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 3–5 kertaa.
  - 8 Sulje HYB-levy ja sentrifugoi arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
  - 9 Aseta HYB-levy esilämmitettyyn lohkoon 95 °C lämpötilaan ja inkuboi 1 minuutti.
  - 10 Laske lämpölohkon lämpötilaksi 40 °C ja jatka inkubointia, kunnes lämpölohko saavuttaa 40 °C lämpötilan (~80 minuuttia).
- Vaiheittainen jäähditys on kriittisen tärkeä asianmukaisen hybridisoinnin kannalta.



**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Kun lämpölohko saavuttaa lämpötilan 40 °C, HYB-levy on vakaa 40 °C:ssa 2 tuntia.

**Ei-sidottujen oligonukleotidien poistaminen****Tarvikkeet**

- ▶ Extension-Ligation Mix -sekoite
- ▶ Suodatinlevy
- ▶ Tiukan protokollan pesupuskuri
- ▶ Yleiskäyttöinen pesupuskuri
- ▶ MIDI-levy

## Valmisteleminen

**1 Valmistele seuraavat tarvikkeet:**

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Extension-Ligation Mix -sekoite	-25...-15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.
Tiukan protokollan pesupuskuri	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti. Varmista, että kaikki saostumat ovat lienneet.
Yleiskäyttöinen pesupuskuri	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.

**2 Kokoa suodatinlevykokoonpanoyksikkö (FPU) *ylhäältä alas*:**

- Kansi
- Suodatinlevy
- Sovitinkaulus
- MIDI-levy

**3 Esipese suodatinlevykalvo seuraavasti.**

- a Lisää kuhunkin kuoppaan 45 µl vaativan pesun puskuria.
- b Peitä suodatinlevy kannella ja sentrifugoi arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa 5 minuutin ajan.

**4 Tarkista, että kaikki suodatinlevyn kuopat tyhjenevät kokonaan. Jos pesupuskuri ei tyhjene kokonaan, sentrifugoi uudelleen arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa, kunnes kaikki neste on mennyt läpi (5-10 minuuttia lisää).****HUOMIO**

On kriittisen tärkeää valvoa sentrifugin lämpötilaa pesuvaiheiden aikana. Jos lämpötila nousee 25 °C:seen tai suuremmaksi, suurempi lämpötila voi johtaa voimakkaampaan alukkeiden sidontaan. Sellaisissa harvoissa tapauksissa, joissa näytteissä on SNV:itä alukkeiden sidonta-alueilla, suurempi sidonnan jäykkyys voi johtaa alleelien jäämiseen pois.

## Toimenpide

- 1 Poista HYB-levy lämpölohkosta ja sentrifugoi arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- 2 Siirrä kunkin näytteen koko tilavuus suodatinlevyn vastaaviin kuoppiin käyttämällä arvoon 55 µl asetettua monikanavapipettiä.
- 3 Peitä suodatinlevy kannella ja sentrifugoi arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa 5 minuutin ajan.
- 4 Pese suodatinlevy seuraavasti.

- a Lisää kuhunkin näytekuppaan 45 µl vaativan pesun puskuria.
  - b Peitä suodatinlevy kannella ja sentrifugoi arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa 5 minuutin ajan.
- 5 Pese levy **toisen** kerran.
  - 6 Jos pesupuskuri ei tyhjene kokonaan, sentrifugoi uudelleen arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa, kunnes kaikki neste on mennyt läpi (5–10 minuuttia lisää).
  - 7 Hävitä kaikki läpivirtausmateriaali ja kokoa FPU uudelleen.
  - 8 Lisää kuhunkin näytekuppaan 45 µl yleiskäyttöistä pesupuskuria.
  - 9 Peitä suodatinlevy kannella ja sentrifugoi arvolla 2 400 × g 20 °C:ssa 10 minuutin ajan.
  - 10 Varmista, että kaikki neste on tyhjentynyt sentrifugoinnin jälkeen. Toista sentrifugointi tarvittaessa.

## Sidottujen oligonukleotidien jatkoligaatio

### Tarvikkeet

- ▶ Extension-Ligation Mix -sekoite
- ▶ Liimapintainen alumiinifoliosulkukansi

#### Toimenpide

- 1 Lisää 45 µl Extension-Ligation Mix -sekoitetta suodatinlevyn kuhunkin näytekuppaan.
- 2 Sulje suodatinlevy ja peitä kannella.
- 3 Inkuboi FPU:ta 37 °C:n lämpötilaan esilämmitetyssä inkubaattorissa 45 minuutin ajan.
- 4 Kun FPU-levy inkuboidaan, valmistelevy AMP-levy (monistuslevy) seuraavassa osassa kuvatulla tavalla.

## PCR-monistus

### Tarvikkeet

- ▶ 96 kuopan PCR-levy
- ▶ PCR-levyn sulkukansi
- ▶ Indeksialukkeet (A501–A508 ja A701–A712)
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ PCR Master Mix -sekoite
- ▶ PCR-polymeraasi
- ▶ 15 ml:n kartioputki

#### Valmisteleminen

- 1 Määritä käytettävät indeksialukkeet Local Run Managerin graafisen levyasettelun mukaisesti.
- 2 Valmistelevy seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Indeksialukkeet (A501–A508 ja A701–A712)	–25...–15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla eli ravistamalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
PCR-polymeraasi	–25...–15 °C	Jätä pakastimeen, kunnes PCR-työliuoksen valmistaminen on tarpeen.
PCR Master Mix -sekoite	–25...–15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla eli ravistamalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

- 3 Valmista tuore 0,05 N NaOH lisäämällä 25 µl 10 N NaOH:ta 4 975 µl:aan RNAasitonta/DNAasitonta vettä.
- 4 Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä AMP.

- 5 Lisää indeksialukkeet AMP-levylle seuraavasti.
- Lisää 4 µl valittuja 2-indeksialukkeita (A501–A508) AMP-levyn asianmukaiseen kuoppaan.
  - Hävitä alkuperäiset valkoiset korkit ja käytä sitten uusia valkoisia korkkeja.
  - Lisää 4 µl valittuja 1-indeksialukkeita (A701–A712) AMP-levyn asianmukaiseen riviin.
  - Hävitä alkuperäiset oranssit korkit ja käytä sitten uusia oransseja korkkeja.

6 Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
PCR-polymeraasi	-25...-15 °C	Poista varastosta ja sentrifugoi hetki. Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen. Jos PCR-polymeraasia käytetään muihin valmisteisiin, palauta polymeraasi varastoon PCR-työliuoksen valmistamisen jälkeen.

7 Valmistele PCR-työliuos seuraavasti.



**HUOMAUTUS**

Alla olevat ohjeet sisältävät 96 näytteen käsittelyyn tarvittavat tilavuudet. Jos näytteitä käsitellään vähemmän, säädä tilavuuksia vastaavasti reagenssien säästämiseksi.

- Lisää 96 näytettä varten 56 µl PCR-polymeraasia 2,8 ml:aan PCR Master Mix -sekoitetta.
- Sekoita kääntelemällä 20 kertaa.

PCR-työliuos on stabiili huoneenlämmössä 10 minuuttia.

Toimenpide

- Poista FPU inkubaattorista ja poista sitten tiivistekansi.
- Peitä suodatinlevy kannella ja sentrifugoi sitten arvolla 2 400 × 20 °C:ssa 2 minuutin ajan.
- Lisää 25 µl 0,05 N NaOH:ta jokaiseen suodatinlevyn kuoppaan.
- Pipetoi ylös ja alas 5–6 kertaa.
- Peitä suodatinlevy kannella ja inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Kun suodatinlevyä inkuboidaan, siirrä 22 µl PCR Master Mix -sekoitetta AMP-levyn kuhunkin kuoppaan, joka sisältää indeksialukkeita.
- Siirrä suodattimesta elutoidut näytteet AMP-levylle seuraavasti.
  - Pipetoi suodatinlevyn ensimmäisen sarakkeen näytteitä ylös ja alas 5–6 kertaa.
  - Siirrä 20 µl suodatinlevystä AMP-levyn vastaavaan sarakkeeseen.
  - Pipetoi huolellisesti ylös ja alas 5–6 kertaa, jotta DNA kombinoituu perusteellisesti PCR Master Mix -sekoitteeseen.
  - Toista siirtovaiheet jäljellä oleville sarakkeille ja siirrä suodatinlevystä AMP-levylle.
- Sulje AMP-levy ja sinetöi se kumitulpalla.
- Sentrifugoi arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- Siirrä AMP-levy monistuksen jälkeiselle alueelle.
- Suorita PCR käyttämällä seuraavaa ohjelmaa lämpösyklilaitteessa:
  - ▶ 95 °C 3 minuutin ajan
  - ▶ 25 sykliä arvoilla:
    - ▶ 95 °C 30 sekunnin ajan
    - ▶ 62 °C 30 sekunnin ajan
    - ▶ 72 °C 60 sekunnin ajan
  - ▶ 72 °C 5 minuutin ajan
  - ▶ Pidä 10 °C:ssa

**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Jos et etene välittömästi PCR-puhdistukseen, AMP-levy voi jäädä lämpösyklilaitteeseen yön ajaksi tai sitä voidaan säilyttää lämpötilassa 2–8 °C enintään 48 tuntia.

**PCR-puhdistus****Tarvikkeet**

- ▶ 50 ml:n kartioputki
- ▶ Liimapintaiset kertakäyttöiset levyn sulkukannet
- ▶ Kaksi MIDI-levyä
- ▶ Eluutiopuskuri
- ▶ PCR-puhdistusrakeet

## Valmisteleminen

## 1 Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
PCR-puhdistusrakeet	2–8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöiseksi 30 minuutin ajan.

## 2 Valmistele 96 näytteelle tuoretta 80 %:n EtOH:ta käyttäen 36 ml absoluuttista EtOH:ta ja 9 ml DNAasitonta/RNAsitonta vettä. Sekoita huolellisesti.

**HUOMAUTUS**

Jos näytteitä käsitellään alle 96 kpl, säädä tilavuuksia vastaavasti reagenssien säästämiseksi.

## Toimenpide

- 1 Sentrifugoi AMP-levyä arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- 2 Merkitse uusi MIDI-levy tunnisteella CLP.
- 3 Käännä PCR-puhdistusrakeita 10 kertaa. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti ja käännä sitten vielä 10 kertaa. Tarkista silmämääräisesti, että rakeet ovat suspendoituneet uudelleen.
- 4 Lisää 45 µl PCR-puhdistusrakeita CLP-levyn kuhunkin kuoppaan.
- 5 Siirrä koko PCR-tuotos AMP-levyn jokaisesta kuopasta vastaavaan CLP-levyn kuoppaan.
- 6 Sulje ja ravista mikrolevyravistimella nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Inkuboi huoneenlämmössä ravistamatta 10 minuuttia.
- 8 Aseta levy magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (~2 minuuttia).
- 9 Kun CLP-levy on magneettisella jalustalla, poista ja hävitä supernatantti huolellisesti.
- 10 Pese rakeet seuraavasti.
  - a Pidä magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl tuoretta 80 %:n EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
  - b Odota vähintään 30 sekuntia tai kunnes supernatantti on kirkasta.
  - c Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin kuopasta.
- 11 Pese rakeet **toisen** kerran.
- 12 Poista ylimääräinen EtOH P20-monikanavapipetillä, jonka arvoksi on asetettu 20 µl.
- 13 Poista CLP-levy magneettiselta jalustalta ja ilmaquivaa rakeita 10 minuutin ajan.
- 14 Lisää jokaiseen näytteeseen 30 µl eluutiopuskuria.
- 15 Sulje CLP-levy ja ravista mikrolevyravistimella nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan. Tarkista ravistelun jälkeen, onko näytteet suspendoitu uudelleen. Jos eivät, toista tämä vaihe.
- 16 Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
- 17 Aseta CLP-levy magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes supernatantti on kirkasta (~2 minuuttia).
- 18 Merkitse uusi MIDI-levy tunnisteella LNP.

- 19 Siirrä 20 µl supematanttia CLP-levyn jokaisesta kuopasta vastaavaan LNP-levyn kuoppaan.
- 20 **[Valinnainen]** Siirrä loput 10 µl supematanttia CLP-levyltä uudelle levyille ja merkitse levy ajon nimellä ja päivämäärällä. Säilytä tätä levyä lämpötilassa -25...-15 °C, kunnes sekvensointiajo ja data-analyysi on valmis. Puhdistettuja PCR-tuotoksia voidaan käyttää vianetsintään näytevirheiden sattuessa.

## TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät tässä kohtaa, sulje LNB-levy ja sentrifugoi arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan. Levy on vakaa jopa 3 tuntia lämpötilassa 2–8 °C.

## Kirjaston normalisointi ja poolaus

### Tarvikkeet

- ▶ 15 ml:n kartioputki
- ▶ 96 kuopan PCR-levy
- ▶ Mikrosentrifugin putket
- ▶ Kirjastorakeet
- ▶ Kirjaston laimennuspuskuri
- ▶ Kirjaston normalisoinnin laimennin
- ▶ Kirjaston normalisoinnin pesu
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ RNAasiton/DNAasiton vesi

### Valmisteleminen

#### 1 Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Kirjastorakeet	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.
Kirjaston laimennuspuskuri	-25...-15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti. Varmista, että kaikki saostumat ovat lienneet.
Kirjaston normalisoinnin laimennin	-25...-15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti. Varmista, että kaikki saostumat ovat lienneet.
Kirjaston normalisoinnin pesu	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Vorteksoi eli ravista voimakkaasti.

#### 2 Valmista tuore 0,1 N NaOH lisäämällä 50 µl 10 N NaOH:ta 4 950 µl:aan RNAasitonta/DNAasitonta vettä.

### Toimenpide

#### 1 Sekoita kirjaston normalisointilaimennin ja kirjastorakeet uudessa 15 ml:n kartioputkessa seuraavasti.



#### HUOMAUTUS

Alla olevat ohjeet sisältävät 96 näytteen käsittelyyn tarvittavat tilavuudet. Jos näytteitä käsitellään vähemmän, säädä tilavuuksia vastaavasti reagenssien säästämiseksi.

- a Lisää 96 näytteelle 4,4 ml kirjaston normalisoinnin laimenninta.
- b Vorteksoi eli ravista kirjastorakeita voimakkaasti 1 minuutin ajan ajoittain kääntäen, kunnes rakeet on suspendoitu uudelleen eikä putken pohjasta löydy rakeita, kun putki on ylösalaisin.
- c Pipetoi kirjastorakeita ylös ja alas 10 kertaa uudelleensuspendoimiseksi.



#### HUOMIO

On kriittisen tärkeää uudelleensuspendoida kirjaston rakeet kokonaan putken pohjalle. P1000:n käyttö varmistaa, että rakeet suspendoidaan homogeenisesti uudelleen ja että putken pohjassa ei ole raemassaa. Tämä on välttämätöntä, jotta saavutetaan virtauskyvetin tasainen klusteritiheys.

- d Pipetoi 96 näytettä varten 800 µl kirjastorakeita kartiomaiseen putkeen, joka sisältää kirjaston normalisointilaimenninta.
  - e Sekoita kääntämällä putki ylösalaisin 15–20 kertaa.
- 2 Lisää 45 µl kirjaston normalisoinnin laimenninta/kirjastorakeiden työliuosta jokaiseen LNP-levyn kuoppaan.
  - 3 Sulje ja ravista mikrolevyravistimella nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan.



#### HUOMAUTUS

Jos jatkat sekvensoinnilla samana päivänä, aloita reagenssikasetin sulatus. Sulata MiSeqDx-reagenssikasetti noudattamalla ohjeita kohdassa *Kirjastojen valmistelu sekvensointia varten sivulla 31*.

- 4 Aseta LNP-levy magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (~2 minuuttia).
- 5 Kun LNP-levy on magneettisella jalustalla, poista ja hävitä supernatantti huolellisesti.
- 6 Poista LNP-levy magneettisesta jalustasta ja pese rakeet kirjaston normalisointipesulla seuraavasti:
  - a Lisää 45 µl kirjaston normalisointipesuliuosta jokaiseen näytekuppaan.
  - b Sulje LNP-levy ja ravista mikrolevyravistimella nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 5 minuutin ajan.
  - c Aseta levy magneettiselle jalustalle vähintään 2 minuutin ajaksi tai kunnes supernatantti on kirkasta.
  - d Poista ja hävitä supernatantti huolellisesti.
- 7 Toista kirjaston normalisointipesu edellisessä vaiheessa kuvatulla tavalla.
- 8 Poista ylimääräinen kirjaston normalisointipesu P20-monikanavapipetillä, jonka arvoksi on asetettu 20 µl.
- 9 Poista LNP-levy magneettiselta jalustalta ja lisää sitten kuhunkin kuoppaan 30 µl 0,1 N NaOH:ta.
- 10 Sulje LNP-levy ja ravista mikrolevyravistimella nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 5 minuutin ajan.
- 11 Merkitse 5 minuutin eluution aikana uusi 96-kuoppainen PCR-levy tunnisteella SGP.
- 12 Lisää 30 µl kirjaston varastointiliuosta kuhunkin kuoppaan.
- 13 Varmista, että kaikki LNP-levyn näytteet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Jos näytteet eivät ole täysin suspendoituneet uudelleen, pipetoi näytettä varovasti ylös ja alas tai napauta kevyesti levyä työtasoa vasten ja ravista sitten vielä 5 minuuttia.
- 14 Aseta levy magneettiselle jalustalle vähintään 2 minuutin ajaksi.
- 15 Siirrä supernatantti LNP-levyltä SGP-levylle käyttämällä monikanavaista pipettiä, joka on asetettu arvoon 30 µl. Sekoita pipetoimalla varovasti ylös ja alas 5 kertaa.
- 16 Sulje SGP-levy ja sentrifugoi arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- 17 Vorteksoi eli ravista kirjaston laimennuspuskuria ja varmista, että kaikki saostumat ovat lienneet kokonaan. Sentrifugoi hetki sisällön keräämiseksi.
- 18 Merkitse uusi mikrosentrifugiputki tunnisteella PAL.
- 19 Määritä näytteet, jotka poolataan sekvensointia varten. Enintään 96 näytettä voidaan poolata sekvensointia varten.
- 20 Siirrä 5 µl kutakin sekvensoitavaa kirjastoa SGP-levyn kustakin kuopasta sarake sarakkeelta PCR:n kahdeksan putken sarjan vastaavaan kuoppaan.
- 21 Siirrä PCR:n kahdeksan putken sarjan sisältö PAL-putkeen. Vorteksoi eli ravista PAL-putkea, kunnes se on täysin sekoitettu.
- 22 Sulje SGP-levy liimapintaisella levytiivisteellä ja merkitse etiketillä, jossa on ajon nimi ja päivämäärä.

**HUOMAUTUS**

SGP-levy voidaan säilyttää  $-25...-15\text{ °C}$ :ssa enintään 3 päivää ja käyttää tarvittaessa kirjastojen poolaamiseen uudelleen.

- 23 Merkitse 2–3 uutta mikrosentrifugiputkea tunnisteella PAL.
- 24 Lisää 585 µl kirjaston laimennuspuskuria DAL-putkiin.
- 25 Siirretään 9 µl PAL-sisältöä jokaiseen DAL-putkeen, joka sisältää kirjaston laimennuspuskuria.
- 26 Pipetoi ylös ja alas 3–5 kertaa ja huuhtelee näin kärki ja varmista, että siirto on valmis.

**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Jos et etene välittömästi sekvensointiin MiSeqDx-laitteella, DAL-putkia voidaan säilyttää lämpötilassa  $-25...-15\text{ °C}$  enintään 28 vuorokauden ajan.

## Kirjaston sekvensointi

**HUOMAUTUS**

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen kirjaston sekvensoinnin työkulut ovat identtiset.

## Kirjastojen valmistelu sekvensointia varten

**Tarvikkeet**

- ▶ MiSeqDx Reagent Kit v3 tai MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro
- ▶ Kirjaston laimennuspuskuri
- ▶ Sisäinen PhiX-kontrollikirjasto

## Valmisteleminen

- 1 Aseta 1,5 ml:n sentrifugiputkille sopiva lämpölohko arvoon  $96\text{ °C}$ .
- 2 Valmista jää-ämpäriin jäävesikylpy.
- 3 Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Reagenssi	Säilytys	Ohjeet
Kirjaston laimennuspuskuri	$-25...-15\text{ °C}$	Sulata huoneenlämmössä. Sekoita vorteksoimalla. Varmista, että kaikki saostumat ovat liuonneet. Sentrifugoi hetki ja aseta jäävesikylpyyn. MiSeqDx-reagenssisarja v3:n mukana toimitetaan tarvittaessa lisää kirjaston laimennuspuskuria.
Sisäinen PhiX-kontrolli	$-25...-15\text{ °C}$	Sulata huoneenlämmössä. Aseta jäävesikylpyyn.
MiSeqDx v3 -reagenssikasettisarja	$-25...-15\text{ °C}$	Anna reagenssikasetin sulaa huoneenlämmössä noin 90 minuuttia tai kunnes se on sulanut kokonaan. Lisätietoja reagenssikasetin valmistelusta on MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v2 -oppaassa (asiakirjanumero 100000021961).
MiSeqDx-virtauskyvetti	$2-8\text{ °C}$	Tuo huoneenlämpöön. Lisätietoja virtauskyvetin valmistelusta on MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v2 -oppaassa (asiakirjanumero 100000021961).
MiSeqDx SBS -liuos (PR2)	$2-8\text{ °C}$	Tuo huoneenlämpöön. Lisätietoja SBS-liuoksen valmistelusta on MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v2 -oppaassa (asiakirjanumero 100000021961).

## Denaturoi ja laimenna sisäinen PhiX-kontrolli

### Tarvikkeet

- ▶ DNAasiton/RNAasiton vesi
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Kirjaston laimennuspuskuri
- ▶ Sisäinen PhiX-kontrollikirjasto
- ▶ TE-puskuri
- ▶ 15 ml:n kartioputki
- ▶ Mikrosentrifugin putket

### Valmisteleminen

- 1 Yhdistä kartiomaisessa putkessa seuraavat tilavuudet valmistaaksesi 0,1 N NaOH:n:
  - ▶ DNAasiton/RNAasiton vesi (2 475 µl)
  - ▶ Varastoerä 10 N NaOH (25 µl)
- 2 Sekoita kääntelemällä putkea useita kertoja.



#### HUOMIO

Juuri laimennetun NaOH:n käyttö on välttämätöntä klusterin muodostamiseksi MiSeqDx:ssä.

Jos PhiX valmistellaan samana päivänä kuin kirjaston normalisointi tehdään, voidaan käyttää samaa 0,1 N NaOH:n varastoerää.

- 3 Laimenna sisäisen PhiX-kontrollin kirjasto 2 nM:ään yhdistämällä seuraavat tilavuudet:
  - ▶ 10 nM Sisäinen PhiX-kontrollikirjasto (2 µl)
  - ▶ 1X TE-puskuri (8 µl)
- 4 Valmistele 1 nM:n sisäisen PhiX-kontrollin kirjasto yhdistämällä seuraavat tilavuudet:
  - ▶ 2 nM sisäinen PhiX-kontrollikirjasto (10 µl)
  - ▶ 0,1 N NaOH (10 µl)
- 5 Sekoita vorteksoimalla hetken ajan.
- 6 Sentrifugoi 1 nM:n sisäistä PhiX-kontrollia arvolla 280 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- 7 Inkuboi 5 minuutin ajan huoneenlämmössä sisäisen PhiX-kontrollin kirjastoliuoksen denaturoimiseksi yksittäisiksi säikeiksi.
- 8 Käytä uutta mikrosentrifugiputkea ja valmistele 20 nM:n sisäisen PhiX-kontrollin kirjasto yhdistämällä seuraavat tilavuudet:
  - ▶ Denaturoitu sisäisen PhiX-kontrollin kirjasto (2 µl)
  - ▶ Esijäähdytetty kirjaston laimennuspuskuri (98 µl)



#### HUOMIO

Denaturoitua 20 pM:n sisäisen PhiX-kontrollin kirjastoa voidaan säilyttää jopa 3 viikkoa lämpötilassa -25...-15 °C kertakäyttöisinä alikvootteina.

### Näytteiden valmistelu sekvensointia varten

- 1 Jatka yhdellä DAL-sekvensointiputkella.
- 2 Jos DAL-putki on säilytetty pakastettuna, sulata se kokonaan ja sekoita pipetoimalla ylös ja alas.
- 3 Jos 20 pM PhiX -sisäinen kontrolli on säilytetty pakastettuna, poista kertakäyttöinen alikvootti, sulata kokonaan, sekoita vorteksoimalla eli ravistamalla ja sentrifugoi sitten hetki.
- 4 Lisää 6 µl 20 pM PhiX -sisäistä kontrollia DAL-putkeen.
- 5 Pipetoi ylös ja alas 3–5 kertaa ja huuhtelee näin kärki ja varmista, että siirto on valmis.
- 6 Sekoita DAL-putki vorteksoimalla täysnopeudella.



- 7 Sentrifugoi DAL-putkea arvolla 1 000 × g 20 °C:ssa 1 minuutin ajan.
- 8 Inkuboi DAL-putkea lämpölokossa 96 °C:ssa 2 minuutin ajan.
- 9 Käännä DAL-putki ylösalaisin 1–2 kertaa inkuboinnin jälkeen sisällön sekoittamiseksi ja aseta se välittömästi jäävesihauteeseen.
- 10 Pidä DAL-putki (poolatut kirjastot) jäävesikylvyssä 5 minuuttia.

### Poolattujen kirjastojen lataaminen kasettiin

- 1 Käytä uutta 1 ml:n pipettikärkeä kalvosulun puhkaisemiseen Load Samples (Latausnäytteet) -merkinnällä varustetun reagenssikasetin säiliön kohdalla.
- 2 Pipetoi 600 µl DAL-putkesta Load Samples (Latausnäytteet) -säiliöön. Vältä koskemasta kalvosulkuun.
- 3 Tarkista säiliö ilmakuplien varalta näytteen latauksen jälkeen. Mikäli mukana on kuplia, vapauta ne taputtamalla kasettia varoen työtasoon.
- 4 Jatka suoraan ajoasetusvaiheisiin MiSeq-käyttöohjelmiston (MOS) liittymän avulla. Lisätietoja ajon valmistelusta MiSeqDx:ssä on *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v2 -oppaassa (asiakirjanumero 100000021961)*.

### Ajon jälkeinen pesu mallilinjapesulla

Sekvensoinnin jälkeen on erittäin suositeltavaa tehdä ajon jälkeinen pesu mallilinjapesulla.



#### HUOMIO

Jos mallilinjaa pesua ei suoriteta, negatiivisten kontrollien tunnistusasteet voivat häiriintyä seuraavassa ajossa.



#### HUOMAUTUS

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen ja kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen ajon jälkeisen pesun työnkulku ovat identtisiä.

### Tarvikkeet

- ▶ Mikrosentrifugin putket
- ▶ Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi
- ▶ Tween 20
- ▶ 5-prosenttinen natriumhypokloriitti
- ▶ MiSeq-putki



#### VAROITUS

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

### Valmisteleminen

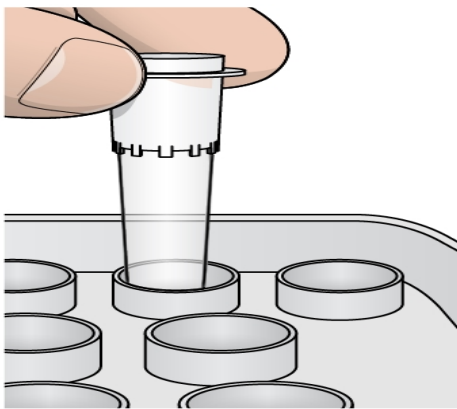
- 1 Valmistele uusi pesuliuos Tween 20:lla ja laboratoriokäyttöön sopivalla vedellä seuraavasti.
  - a Lisää 5 ml 100-prosenttista Tween 20 -liuosta 45 ml:aan laboratoriokäyttöön sopivaa vettä. Näitä tilavuuksia käyttämällä saadaan 10-prosenttista Tween 20 -liuosta.

- b Lisää 25 ml 10-prosenttista Tween 20 -liuosta 475 ml:aan laboratoriokäyttöön sopivaa vettä. Näitä tilavuuksia käyttämällä saadaan 0,5-prosenttista Tween 20 -pesuliuosta.
  - c Sekoita kääntelemällä viisi kertaa.
- 2 Valmistelee uusi natriumhypokloriittipesuliuos laboratoriokäyttöön sopivalla vedellä seuraavasti.
- a Lisää 36 µl 5 %:sta natriumhypokloriittiliuosta 864 µl:aan laboratoriokäyttöön sopivaan veteen. Näillä tilavuuksilla saadaan natriumhypokloriittiliuos, jonka laimennussuhde on 1:25.
  - b Lisää 50 µl 1:25-suhteessa laimennettua natriumhypokloriittia 950 µl:aan laboratoriolaatuista vettä MiSeq-putkeen.
- 3 Oikean natriumhypokloriittipitoisuuden käyttö on tärkeää. Tarkista ehdottomasti natriumhypokloriittiprosenttiosuus tuote-etiketistä. Jos pitoisuus on liian korkea, se saattaa johtaa klustereiden luonnin epäonnistumiseen myöhemmissä ajoissa. Jos 5 %:sta natriumhypokloriittiliuosta ei ole saatavilla, valmista 1 ml 0,01 %:n natriumhypokloriittiliuosta laboratoriokäyttöön sopivaan veteen. Älä käytä natriumhypokloriittiliuosta huolto- tai valmiustilapesun yhteydessä.
- 4 Valmistelee pesukomponentit uudella pesuliuksella seuraavasti.
- a Lisää 6 ml pesuliuosta pesualustan kuhunkin säiliöön.
  - b Lisää 350 ml pesuliuosta 500 ml:n pesupulloon.

## Toimenpide

- 1 Vie MiSeq-putkea, jossa on 0,01 %:sta natriumhypokloriittipesuliuosta pesualustan asemaan 17, kunnes putken kaula on tasoissa alustan kanssa.  
Putki siirtää Tween 20- ja laboratoriokäyttöön sopivaa vesiliuosta asemasta 17.

Kuva 2 MiSeq-putki pesualustan asemassa 17



### HUOMIO

Asenna ehdottomasti MiSeq-putki, jossa on natriumhypokloriittiliuosta, vain alustan asemaan 17. Putken asentaminen muuhun asemaan saattaa johtaa klustereiden luonnin epäonnistumiseen myöhemmissä ajoissa.

- 2 Kun pesu on valmis, valitse **Start Wash** (Käynnistä pesu).  
Ohjelmisto nostaa annostelijat automaattisesti reagenssijäähdyttimessä.
- 3 Valitse **Perform optional template line wash** (Suorita valinnainen malliinjapesu) Post-Run Wash (Ajon jälkeinen pesu) -näytöltä.
- 4 Avaa reagenssilokeron ja reagenssijäähdyttimen luukku ja liu'uta käytettävä reagenssikasetti reagenssijäähdyttimestä.
- 5 Liu'uta pesualustaa reagenssijäähdyttimeen, kunnes se pysähtyy, ja sulje sitten reagenssijäähdyttimen luukku.
- 6 Nosta annostelijan kahvaa MiSeqDx SBS -liuospullon ja jätepullon edessä, kunnes se lukittuu paikalleen.

- 7 Poista MiSeqDx SBS -liuospullo ja vaihda se pesupulloon.
- 8 Poista pesupullo ja hävitä sisältö asianmukaisesti. Palauta jätepullo reagenssilokeroon.
- 9 Laske annostelijan kahvaa hitaasti. Varmista, että annostelijat laskeutuvat pesu- ja jätepulloon.
- 10 Sulje reagenssilokeron luukku.
- 11 Valitse **Next** (Seuraava). Ajon jälkeinen pesu alkaa.
- 12 Kun pesu on suoritettu, jätä käytetty virtauskyvetti, pesualusta ja jäljelle jäävän pesuliuksen sisältävä pesupullo instrumenttiin.
- 13 Annostelijat jäävät ala-asentoon, mikä on normaalia. Jätä käyttämätön pesuliuos pesualustalle ja pesupulloon, jotta annostelijat eivät kuivu ja jotta ilma ei pääse järjestelmään.

## Sekvensoitujen kirjastojen uudelleenanalysoiminen

Sekvensointiajon jälkeen saman sekvenssitietojoukon uudelleenanalysoiminen voidaan suorittaa noudattamalla *Requeue Analysis* (Uudelleenjonotusanalyysi) -ohjeita *MiSeqDx:n Local Run Manager -ohjelmiston viiteoppaassa* (asiakirjanumero 100000011880). Uudelleenjonotusanalyysi on rajoitettu moduuliin, jota käytettiin alun perin sekvensointiin. Uudelleenjonotusanalyysin avulla voidaan muokata näytetietoja ja luoda uusia raportteja.



### HUOMAUTUS

Sekvensointiin käytettävissä poolatuissa kirjastoissa on oltava 24–96 näytettä. Näytteiden osajoukon raportit saadaan syöttämällä vähemmän näytteitä uudelleenjonotuksen määrityksen aikana. Raportteja luodaan vain näytteille, jotka on syötetty uudelleenjonotuksen asetuksen aikana.

## Poolattujen kirjastojen uudelleentestaamisen vaihtoehdot

TruSight-kystisen fibroosin 139-variantin määrittäminen (TruSight CFCS) käyttää samaa kirjaston valmistelutyönkulkua ja reagenssia kuin TruSight-kystisen fibroosin kliinisen sekvensoinnin määrittäminen. Kirjaston valmistelumenettely edellyttää määrityksen valintaa ennen aloittamista. Kuitenkin sellaisissa tapauksissa, joissa poolatut kirjastot (DAL-putket) vaativat lisätästä (esimerkiksi sekvensointiajon toistaminen tai refleksitestausta toisella TruSight CF -määrityksellä), DAL-putkia voidaan käyttää tarpeen mukaan toistamatta kirjaston valmistelua. Testaa uudelleen seuraavasti:



### HUOMAUTUS

Sekvensointiin käytettävissä poolatuissa kirjastoissa on oltava vähintään 24–96 näytettä. Näytteiden osajoukon raportit saadaan syöttämällä vähemmän näytteitä sekvensointiajon määrityksen aikana. Kaikki poolatut näytteet sekvensoidaan, mutta raportteja luodaan vain sekvensoinnin aikana syötetyille näytteille.

- 1 Määritä ajo kohdassa *Määrityksen valinta ja ajon valmistelu* sivulla 20 annettujen ohjeiden mukaisesti.
- 2 Sekvensoi kirjastot noudattamalla ohjeita, jotka annetaan kohdassa *Kirjaston sekvensointi* sivulla 31.
- 3 Kun sekvensointi on ajettu, pese MiSeqDx noudattamalla ohjeita, jotka annetaan kohdassa *Ajon jälkeinen pesu malliinajapesulla* sivulla 33.

## Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen tulosten tulkinta

- ▶ Kystisen fibroosin 139-varianttimääritys on suunniteltu havaitsemaan 139 CFTR-varianttia, mukaan lukien ACMG:n suosittelemat variantit (*Taulukko 2*).
- ▶ Määritysraportissa luetellaan näytteiden nimet ja genotyyppi kullekin näytteelle havaitun variantin osalta.
  - ▶ Kaikista näytteistä tutkitaan 134 kystistä fibroosia aiheuttavaa varianttia ja ACMG:n suosittelema R117H-variantti. Määritysraportissa on lueteltu vain havaitut mutanttialleelit.

- ▶ PolyTG/PolyT-variantti ilmoitetaan vain, jos näytteestä on tunnistettu R117H-variantti. R117H-variantin omaaville potilaille on tehtävä lisätestaus, jolla määritetään, onko tehtävä testaus PolyTG-/PolyT-variantille, joka voi vaikuttaa kliiniseen fenotyyppiin (esim. 12-13(TG) tai 5T), sen suhteen, onko kyseinen variantti cis- vai trans-puolen suuntauksessa suhteessa R117H-varianttiin.



#### HUOMAUTUS

PolyTG/PolyT-genotyyppi määritetään kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksellä, joka perustuu yleisimpien genotyyppien read-laskentaan. Seuraavan sukupolven sekvensoinnin digitaalisen luonteen vuoksi määrittäminen pystyy saavuttamaan korkean tarkkuuden useiden havaintojen perusteella verrattuna muihin sekvensointipohjaisiin tekniikoihin, jotka käyttävät vain muutamia havaintoja.

- ▶ Jos näytteellä on homotsygoottinen F508del- tai I507del-genotyyppi, jos yksi tai useampi kolmesta hyvänlaatuisesta polymorfismista I506V, I507V ja F508C havaitaan, tämä ilmoitetaan näytteen kohdalla. Jos kaikki kolme hyvänlaatuista polymorfismia ovat tyypiltään luonnonvaraisia, raportissa todetaan, että näytteessä ei ole I506V-, I507V- ja F508C-variantteja.



#### HUOMAUTUS

Koska tämä on sekvensointiin perustuva määrittäminen, nämä kolme hyvänlaatuista polymorfismia eivät vaikuta F508del:n tai I507del:n raportointiin. Siten havaittuun tulokseen ei tehdä korjauksia.

- ▶ Kun näyte tunnistetaan heterotsygoottiseksi ja näytteestä havaitaan sekä luonnonvaraisia että mutanteja alleeleja, genotyyppin tulokseksi ilmoitetaan HET.
- ▶ Kun näyte tunnistetaan homotsygoottiseksi ja näytteestä havaitaan vain mutanteja alleeleja, genotyyppin tulokseksi ilmoitetaan HET.
- ▶ Jos näytteestä ei tunnisteta varianttia, raportti osoittaa, että paneelivariantteja ei havaita.
- ▶ Määrittämisraportti sisältää kunkin näytteen tunnistusasteen. Tunnistusaste lasketaan ennalta määritettyä luotettavuusraja-arvoa vastaavien varianttiasemien/-alueiden määränä jaettuna tutkittujen varianttiasemien/-alueiden kokonaisuudella.
  - ▶ Ehdollista raportointia edellyttävien näytteiden tapauksessa myös muut tutkitut variantit otetaan huomioon tunnistusasteen laskelmassa.
  - ▶ Kaikki variantit, joiden ennalta määritetty luotettavuusraja-arvo alitti kynnyksarvon, ilmoitetaan muodossa No call (Ei tunnistusta). On suositeltavaa toistaa näyte.
- ▶ Näytetulosta pidetään kelvollisena vain, jos tunnistusaste on  $\geq 99\%$ . Jos tunnistusaste on  $< 99\%$ , testi raportoidaan arvolla Fail (Epäonnistui), ja näyte on toistettava.



#### HUOMAUTUS:

Jos näytteen tunnistusaste on  $< 50\%$ , testi raportoidaan arvolla Fail (Epäonnistui) ja raportissa näkyy Sample Failed (Näyte epäonnistunut) -kommentti. Varianttietoja ei näytetä. Tämä näyte on toistettava.

- ▶ On suositeltavaa, että käyttäjä tarkistaa synteettisillä näytteillä validoidut variantit (katso Tarkkuustaulukko) validoidulla vertailumenetelmällä ennen ensimmäisen potilastuloksen ilmoittamista näillä varianteilla.
- ▶ Jos näytteestä tunnistetaan useampi kuin kaksi varianttia, on suositeltavaa, että käyttäjä tarkistaa tuloksen toistamalla näytteen käyttämällä kystisen fibroosin 139-variantin määrittäystä tuoreella gDNA-ututeella, jotta voidaan sulkea pois näytteen ristikontaminaation mahdollisuus.



#### HUOMAUTUS

Haploryhmän tyyppin vaiheistusta on harkittava, kun havaitaan kaksi tai useampia variantteja.

- ▶ Kaikki varianttitulkinnat saa tehdä vain valtuutettu kliininen molekyyli geenitekniikka tai muu luvan saanut ammattilainen paikallisten menettelyjen ja ohjeiden mukaisesti.<sup>15</sup> Mahdollisia tulkintaviitteitä ovat muiden muassa: CFTR2-tietokanta,<sup>11</sup> Sosnayn artikkeli,<sup>13</sup> ACMG:n vuoden 2004 ohjeet<sup>1</sup> ja vuoden 2011 ACOG-komitean mielipidelausunto.<sup>2</sup> Lisätietoja tulosten laskemisesta ja esittämisestä tai tekstitiedostoraportin sisällön kuvauksesta on MiSeqDx:n mukana asennetun analyysiohjelmiston oppaissa. Katso Local Run Manager -ohjelmiston tiedot *Local Run Manager -ohjelmiston viiteoppaasta MiSeqDx:lle (asiakirjanumero 100000011880)* ja *Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Analysis Module -työnkulkuoppaasta (asiakirjanumero 100000100945)*.

## Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen tulosten tulkinta

Kystisen fibroosin kliininen sekvensointimääritys on suunniteltu sekvensoimaan kaikki CFTR-geenin proteiinikoodausalueet 27 eksoniin, 5–30 emästä vierekkäisessä intronisessa jaksossa, ~ 100 nt:n sivuttaissekvenssi kohtien 5' ja 3' UTR:issä ja kaksi syvää intronista mutaatiota (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T). **Taulukko 3** luettelee tarkat sekvensoidut alueet. Lisäksi määrityksessä raportoidaan PolyTG/PolyT-variantti ja kaksi suurta deleetiota (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- ▶ Määritysraportissa luetellaan näytteiden nimet ja genotyyppi kullekin näytteelle havaitun variantin osalta.
  - ▶ Genomikoordinaatti, Human Genome Variation Society (HGVS) cDNA -nimi ja proteiinin nimi (jos saatavilla) ilmoitetaan kustakin variantista.
  - ▶ Varianttityyppi yksilöidään yksittäiseksi nukleotidivariantiksi (SNV), deleetio-/lisäysvariantiksi (DIV), PolyTG/PolyT-variantiksi (PolyTGPolyT) tai suureksi deleetioksi (DEL).
  - ▶ Genotyypin tunnistus (heterotsygoottinen tai homotsygoottinen) voidaan päätellä "viite-emäksen" tiedosta, joka antaa vertailusekvenssin tässä genomikoordinaatissa, ja "tulokuvauksesta", joka ilmoittaa kaksi alleelia näytteen genomisijainnissa. Jos viite on esimerkiksi "G" ja tulos on "A/G", tämä tarkoittaa G>A-muutosta tässä genomikoordinaatissa ja että genotyyppi on heterotsygoottinen varianttialleelille. Vastaavasti jos viite on esimerkiksi "G" ja tulos on "T/T", tämä tarkoittaa G>T-muutosta tässä genomikoordinaatissa ja että genotyyppi on homotsygoottinen varianttialleelille.
  - ▶ Sekvensoinnin syvyys varianttisijainnissa annetaan "Depth" (Syvyys) -kentässä ja alleelitaajuus "Frequency" (Taajuus) -osassa.
- ▶ Määritysraportti sisältää kunkin näytteen tunnistusasteen. Tunnistusaste lasketaan ennalta määritettyä luotettavuusraja-arvoa vastaavien varianttiasemien/-alueiden määränä jaettuna tutkittujen varianttiasemien/-alueiden kokonaisuudella.
  - ▶ Genomikoordinaatti sijainnille tai alueelle, jonka luotettavuusarvo on kynnysarvon alapuolella, on lueteltu erikseen "Coordinates not called" (Koordinaatteja ei tunnistettu) -osassa. Käyttäjien olisi arvioitava sijainnit, joita ei tunnistettu, asiaankuuluvien varianttietojen perusteella, jotta voidaan tunnistaa mahdollisesti puuttuvat variantit ja niiden vastaavat populaatioesiintyvyydet sen määrittämiseksi, tarvitaanko näytteen toisto.
- ▶ Näytetulosta pidetään kelvollisena vain, jos tunnistusaste on  $\geq 99\%$ . Jos tunnistusaste on alle  $99\%$ , testi raportoidaan arvolla Fail (Epäonnistui), ja näyte on toistettava.
- ▶ On suositeltavaa, että käyttäjä tarkistaa tarkkuustutkimuksen validoinnin ulkopuolella olevat variantit (katso **Tarkkuus sivulla 59**) validoidulla vertailumenetelmällä ennen ensimmäisen potilastuloksen ilmoittamista näillä varianteilla.



### HUOMAUTUS

Haploryhmän tyypin vaiheistusta on harkittava, kun havaitaan kaksi tai useampia varianteja.

- ▶ Kaikki varianttitulkinnat saa tehdä vain valtuutettu kliininen molekyyli geenitekniikka tai muu luvan saanut ammattilainen paikallisten menettelyjen ja ohjeiden mukaisesti.<sup>15</sup> Mahdollisia tulkintaviitteitä ovat muiden muassa: CFTR2-tietokanta<sup>11,12</sup>, Sosnayn artikkeli<sup>13</sup>, ACMG:n vuoden 2004 ohjeet<sup>1</sup> ja vuoden 2011 ACOG-komitean mielipidelausunto<sup>2</sup>.

Lisätietoja tulosten laskemisesta ja esittämisestä tai tekstitiedostoraportin sisällön kuvauksesta on MiSeqDx:n mukana asennetun analyysiohjelmiston oppaissa. Katso Local Run Manager -ohjelmiston tiedot *Local Run Manager -ohjelmiston viiteoppaasta MiSeqDx:lle (asiakirjanumero 100000011880)* ja *Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Analysis Module -työnkulkuoppaasta (asiakirjanumero 1000000100946)*.

- ▶ Geeniteknikko syöttää Local Run Manager -ohjelmiston avulla tulkinta-arvon kullekin näytteessä ilmoitetulle variantille avattavan valikon kautta. Tulkinnan arvovalinnat ovat: CF-causing (Aiheuttaa kystistä fibroosia), Mutation of varying clinical consequence (Eri kliinisten merkitysten mutaatio), Mutation of unknown significance (Tuntemattoman merkityksen mutaatio) tai Non-CF causing (Ei aiheuta kystistä fibroosia). Annettu arvo lisätetään tulostiedostoon ja näytetään kliinisen sekvenssimäärityksen raportin tulkintasarakkeessa.

## Laadunvarmistusmenetelmät

Hyvien laboratoriokäytäntöjen mukaisesti kontrollimateriaali on arvioitava, jotta voidaan havaita erot verenkäsittelyssä ja teknisissä toimenpiteissä käyttäjän laboratorioissa. Tällaiset erot voivat aiheuttaa merkittävää tulosten vaihtelua.

- **Negatiivinen kontrolli (NTC tai Ei mallia -kontrolli)** – Negatiivisen kontrollin käyttö on tarpeen jokaisen ajon yhteydessä, jotta mahdolliset kontaminaatiotapaukset voidaan havaita. Negatiivisen kontrollin tunnistusasteen on oltava alle 10 %. Jos negatiivinen kontrolli tuottaa yli 10 %:n tunnistusasteen ja malliilinjan pesu tehtiin edellisen ajon yhteydessä, määrityksen aikana on saattanut tapahtua kontaminaatio. Määrityksen katsotaan tällöin epäonnistuneen, ja koko määritys on toistettava kirjaston valmistelusta alkaen. Negatiivinen kontrollinäyte ilmoitetaan hyväksytyksi (Pass), jos se tuottaa tunnistusasteen  $\leq 10\%$ , ja hylätyksi (Fail), jos tunnistusaste on  $> 10\%$ .



### HUOMAUTUS

On kriittisen tärkeää tehdä malliilinjan pesu jokaisen sekvenssijon jälkeen, jotta negatiivisen kontrollin tunnistusaste ei nouse. Jos negatiivisen kontrollin tunnistusaste on  $> 10\%$ , eikä malliilinjan pesua suoritettu edellisessä ajossa, on suositeltavaa, että käyttäjä suorittaa ajon jälkeisen pesun malliilinjapesulla ja toistaa sekvenssijon.

- **Positiiviset kontrollit** – Positiivinen DNA-kontrollinäyte vaaditaan joka ajolle. Positiivisen kontrolli-DNA-näytteen on oltava hyvin määritetty näyte, jossa on vähintään yksi tunnettu CFTR-variantti.<sup>16</sup> Illumina suosittelee käyttämään rotaatiomuotoisia positiivisia kontrolleja, jotka ovat ACMG:n vuoden 2008 teknisten standardien ja KF-mutaatiotestauksen ohjeiden mukaisia<sup>17</sup> ja ACMG:n vuoden 2013 seuraavan sukupolven sekvensointia varten laadittujen kliinisten laboratoriostandardien mukaisia.<sup>18</sup> Positiivisen kontrollinäytteen on tuotettava odotettu genotyyppi. Jos positiivinen kontrolli saa aikaan odotetusta poikkeavan genotyypin, se johtuu virheestä näyteseurannassa tai virheellisestä indeksointialukkeiden kirjauksesta. Koko määritys on toistettava kirjaston valmistelusta alkaen. Positiivinen kontrollinäyte ilmoitetaan hyväksytyksi (Pass), jos se tuottaa tunnistusasteen  $\geq 99\%$ , ja hylätyksi (Fail), jos tunnistusaste on  $< 99\%$ .
- **Luonnonvaraisen tyypin kontrolli** – Luonnonvaraisen tyypin DNA-kontrollinäytettä suositellaan joka ajolle. Luonnonvaraisen tyypin kontrollinäytteen on oltava hyvin luonnehdittu näyte, joka ei sisällä mitään CFTR-variantteja. Luonnonvaraisen tyypin kontrollinäytteen on tuotettava odotettu genotyyppi. Jos luonnonvaraisen tyypin kontrolli saa aikaan odotetusta poikkeavan genotyypin, se johtuu virheestä näyteseurannassa tai virheellisestä indeksointialukkeiden kirjauksesta. Koko määritys on toistettava kirjaston valmistelusta alkaen.
- Näytetulosta pidetään kelvollisena vain, jos tunnistusaste on  $\geq 99\%$ . Jos tunnistusaste on alle 99 %, testi raportoidaan arvolla Fail (Epäonnistui), ja näyte on toistettava.
- Ennen tämän tuotteen ensimmäistä käyttökertaa käyttäjän omassa laboratorioissa määrityksen suorituskyky on todennettava testaamalla useita positiivisia ja negatiivisia näytteitä, joiden tuottamat tulokset tunnetaan.
- Kaikki laadunvalvontatoimet on suoritettava paikallisten, osavaltiotason ja/tai liittovaltion tai muiden voimassa olevien säännösten tai akkreditointivaatimusten mukaisesti.

## Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen suorituskykyominaisuudet

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen suorituskykyominaisuudet perustuvat tutkimuksiin, joissa hyödynnettiin kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määritystä. TruSight- ja MiSeqDx-määritysten vastaavuus käsitellään kohdassa *Suorituskyvyn vastaavuus Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen kanssa sivulla 57.*

### Tarkkuus

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen tarkkuus arvioitiin 500 näytteellä, jotka edustivat laajaa joukkoa CFTR-variantteja neljästä eri lähteestä. Tarkkuustietojen ensisijainen lähde oli kliininen tarkkuustutkimus, joka tehtiin 366 näytteen paneelilla. Suurin osa (n = 355) näytteistä koostui ihmisverestä eristetyistä arkistoiduista, anonymisoiduista kliinisistä gDNA-näytteistä. Loput 11 näytettä saatiin kaupallisesti saatavilla olevista solulinjanäytteiden kirjastoista.

Tämän tutkimuksen tietoja täydennettiin tarkkuustiedoilla, jotka saatiin 68 toistettavuustutkimuksessa arvioidusta solulinjanäytteestä, 14 kliinisellä näytteellä eristämismenetelmän arvioinnin analyysitutkimuksesta ja 52 synteettisellä plasmidinäytteellä. Synteettiset plasmidit suunniteltiin sisältämään harvinaisten varianttien genomikonteksti, ja ne sisälsivät yhdestä yhdeksään varianttia saman rakenteen sisällä. Ne lineaarisoiitiin, laimennettiin genomi-DNA:ta vastaaviksi kopionumeroiksi ja sekoitettiin ihmisen genomi-DNA-näytteisiin, jotka olivat luonnonvaraista genotyyppiä, vastaavilla kopionumeroilla jäljittelemään heterotsygoottista näytettä.

137 SNV-kohdan/pienen indelikohdan genotyyppityksen tuloksia, mukaan lukien PolyTG-/PolyT-alue, verrattiin Sangerin kaksisuuntaiseen sekvenssianalyysiin. Paneelin kahden suuren deleetion vertailumenetelmänä käytettiin kahta validoitua PCR-pohjaista määritystä. Jokaisessa kahdennetussa PCR-määrityksessä hyödynnettiin kahta alukesarjaa, jotka erottavat toisistaan luonnonvaraisen tyypin, heterotsygoottiset ja homotsygoottiset genotyypit. Toinen alukesarjoista suunniteltiin olemaan deleetion murtumapisteiden vieressä, kun taas toinen monisti deleetion sisäistä aluetta. Nämä kaksi tuotetta havaittiin koon erottelulla agarosigeelissä.

PCR-määritykset validoitiin käyttämällä 28 näytteen (22 näytettä kutakin deleetiota varten) paneelia, joka koostui solulinjoista ja verestä saaduista genomi-DNA-näytteistä ja synteettisistä plasmideista, jotka kattoivat WT-, HET- ja HOM-genotyypit kunkin suuren deleetion osalta. PCR-määrityksillä vahvistettiin olevan 100 %:n spesifisyys ja toistettavuus kaikkien testattujen näytteiden osalta arvioimalla PCR-tuotteet agarosigeelillä. PCR-määritysten tarkkuus vahvistettiin Sanger-sekvensoinnilla, ja tarkkuuden todettiin olevan 100 % kaikissa näytteissä.

Tarkkuus määritettiin kullekin genotyyppille kolmella tilastollisella menettelyllä. Positiivinen vastaavuus (PA) laskettiin kullekin variantin genotyyppille jakamalla vastaavien variantitunnistusten näytteiden määrä näytteiden kokonaismäärällä niin, että kyseinen variantti on yksilöity vertailumenetelmillä. Negatiivinen vastaavuus (NA) laskettiin kaikissa luonnonvaraisen tyypin (WT) paikoissa jakamalla yhtäpitävien WT-paikkojen määrä vertailumenetelmillä määritellyllä WT-paikkojen kokonaismäärällä. Kokonaisvastaavuus (OA) laskettiin kaikissa raportoiduissa paikoissa jakamalla yhtäpitävien WT-paikkojen ja varianttipaikkojen määrä vertailumenetelmillä määritellyllä paikkojen raportoidulla määrällä.

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen genotyyppitaso PA oli 100 %. Kaikkien WT-paikkojen NA oli > 99,99 %, ja kaikkien raportoitujen paikkojen OA oli > 99,99 %. Kaikki testitulokset perustuvat alkutestaukseen.

Taulukko 14 Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen yleinen tarkkuus

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>T	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100



Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_2052delAAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_2176insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X (C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3 774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23 <sup>§</sup>	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1 <sup>§</sup>	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A <sup>¶</sup>	SNV	c.2490+1G>T <sup>¶</sup>	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P <sup>^</sup>	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 <sup>^</sup>	0	100	100	100
Y1092X (C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	cDNA-nimi	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_ 4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT <sup>€</sup>	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	-	100
I506V <sup>¥</sup>	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	-	100	100
I507V <sup>¥</sup>	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	-	100	100
F508C <sup>¥</sup>	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	-	100	100
Yhteensä			67 522		557		66 965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV on deleetio-insertiovariantin lyhenne.

\* Sangerin raportissa P205S-variantti todettiin heterotsygoottiseksi kliinisen näytteen osalta. Sangerin jäljitystietojen tarkastelu osoitti kuitenkin, että variantti oli itse asiassa homotsygoottinen ja että se oli raportoitu virheellisesti. MiSeqDx raportoi variantin homotsygoottiseksi.

§ Synteettinen heterotsygoottinen näyte eksoni 8:lle ilmoitettiin heterotsygoottiseksi variantille CFTR dele22, 23. Lisätutkimukset paljastivat, että tämä tulos johtui todennäköisesti lievästä kontaminaatiosta.

^ Alkuperäinen synteettinen heterotsygoottinen näyte todettiin väärin valmistelluksi. Kun se myöhemmin testattiin sen jälkeen, kun näyte oli valmisteltu uudelleen käyttäen samaa plasmidia, se havaittiin.

€ Kun R117H on positiivinen, PolyTG/PolyT-variantti raportoidaan lisäksi.

¥ Yhden homotsygoottisen F508del-variantin osalta raportoitiin lisäksi kolme muuta luonnonvaraista emästä (eli variantit I506V, I507V, F508C), joita ei tunnistettu näytteestä.

¶ Määrityksen alkuperäinen validointitutkimus sisälsi kaksi synteettistä näytettä, jotka sisälsivät nukleotidimuutoksen c.2490+1G>T variantille 2622+1 G>A (tiedot sisältyvät tähän taulukkoon). Toinen validointitutkimus tehtiin myöhemmin synteettisellä näytteellä, joka sisälsi nukleotidimuutoksen c.2490+1G>A tukemaan varianttiin liittyvää todellista nukleotidimuutosta (c.2490+1G>A).

Taulukko 15 Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen tarkkuus I506V:lle, I507V:lle ja F508C:lle.

Variantti (yleinen nimi)	Tunnistuksia yhteensä varianttia kohden	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Negatiiviset tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
		Kliiniset näytteet	Solinjan näytteet	Synteettiset näytteet						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Taulukko 16 Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen tarkkuus polyTG/PolyT-varianteille

PolyTGPolyT- genotyyppi	Kliinisten näytteiden määrä	Solinjan näytteiden määrä	Synteettisten näytteiden määrä	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä*	Tarkkuus, %
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0

PolyTGPolyT- genotyyppi	Kliinisten näytteiden määrä	Solulinjan näytteiden määrä	Synteettisten näytteiden määrä	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä*	Tarkkuus, %
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
<b>Yhteensä**</b>		<b>448</b>		<b>4</b>	<b>3</b>	<b>98,44</b>

\* Näytteitä ei testattu uudelleen.

^ Yksi ei-vastaava tulos oli lisääntymistutkimuksesta. Näytteen PolyTG/PolyT-tulos oli yhtäpitävä kaikissa 18 replikaatissa, mutta ristiriitainen Sangerin kaksisuuntaisen sekvensoinnin osalta.

\*\* PolyTG/PolyT-variantin kokonaisnäytemäärä on 448, koska kaikki synteettiset näytteet (n = 52) on muodostettu sekoittamalla lineaarisia plasmideja yhteen kahdesta solulinjan näytteestä, jotka olivat osa lisääntymistutkimusta. Koska PolyTG/PolyT-variantin raportointi näiden synteettisten lisänäytteiden kohdalla johtaisi variantin yliportointiin, synteettiset näytteet jätettiin tämän analyysin ulkopuolelle.



## Toistettavuus

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen toistettavuus määritettiin sokkotutkimuksen avulla käyttäen kolmea tutkimuskeskusta ja kahta käyttäjää kussakin keskuksessa. Kukin käyttäjä testasi kussakin kohdassa kaksi hyvin määritettyä paneelia, joissa kussakin oli 46 näytettä, yhteensä 810 tunnistusta testipaikkaa kohti. Paneelit sisälsivät genomi-DNA:n sekoituksen lymfoblastoidisolulinjoista, joissa oli tunnettuja variantteja *CFTR*-geenissä, sekä leukosyytitöntä verta, jossa oli lisätynä lymfoblastoidisolulinjoja, joilla oli tunnettuja variantteja *CFTR*-geenissä. Verinäytteet otettiin, jotta määrityksen työnkulun ensisijaisena syötteenä käytettävän gDNA:n valmistelussa käytetyt eristämisvaiheet voitiin sisällyttää.

Näytteen läpäisyaste, joka määriteltiin laadunvarmistusmittareiden läpäisevien näytteiden määränä ensimmäisellä yrityksellä, oli 99,9 %.

Kaikkien varianttien genotyyppitason positiivinen vastaavuus oli 99,77 %. Kaikkien WT-kohtien negatiivinen vastaavuus oli 99,88 %, ja kaikkien ilmoitettujen kohtien kokonaisvastaavuus 99,88 %. Kaikki testitulokset perustuvat alkutestaukseen. Toistettavuustutkimuksessa ei tehty uusintatestejä.

Taulukko 17 Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen toistettavuus

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset vastaavat tunnistukset (variantit)			Negatiiviset vastaavat tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)			Värien tunnis- tusten määrä	Ei tunnis- tuksia, määrä	Positiiv- inen vastaavuus (%)	Negatiiv- inen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
					Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3	Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C ei esiinny	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset vastaavat tunnistukset (variantit)			Negatiiviset vastaavat tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)			Väärien tunnis- tusten määrä	Ei tunnis- tuksia, määrä	Positiiv- inen vastaavuus (%)	Negatii- vinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
					Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3	Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3					
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
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	–	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	–	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	–	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

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset vastaavat tunnistukset (variantit)			Negatiiviset vastaavat tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)			Väärien tunnis- tusten määrä	Ei tunnis- tuksia, määrä	Positiiv- inen vastaavuus (%)	Negatiiv- inen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
					Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3	Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3					
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	–	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	–	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	–	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	–	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	–	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Paneeli	Näyte-numero	Näytteen genotyyppi	Variantit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset vastaavat tunnistukset (variantit)			Negatiiviset vastaavat tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)			Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä	Positiivinen vastaavuus (%)	Negatiivinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
					Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3					
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	–	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	–	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>§</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>§</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>^</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>^</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	–	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

Paneeli	Näyte- numero	Näytteen genotyyppi	Vari- antit	Tunnistuksia yhteensä/ tutkimuspaikka	Positiiviset vastaavat tunnistukset (variantit)			Negatiiviset vastaavat tunnistukset (luonnonvarainen tyyppi)			Väärin tunnis- tusten määrä	Ei tunnis- tuksia, määrä	Positii- vinen vastaavuus (%)	Negatii- vinen vastaavuus (%)	Yleinen vastaavuus (%)
					Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3	Testi- paikka 1	Testi- paikka 2	Testi- paikka 3					
B	86 <sup>§</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>§</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	–	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
		Yhteensä		74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

\* Yhden replikaatin N1303K-varianttia vastaava luonnonvaraisen tyypin sijainti aiheutti tunnistuksen epäonnistumisen riittämättömän kattavuuden vuoksi.

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

\*\* Todisteet osoittavat, että käyttäjä vaihtoi todennäköisesti keskenään näytteet 9 ja 10 ennen kirjaston valmistelua.

§ Kahden näytteen yhden replikaatin M1V-varianttia vastaava luonnonvaraisen tyypin sijainti aiheutti tunnistuksen epäonnistumisen riittämättömän kattavuuden vuoksi.

Taulukko 18 Lisätietoa eri varianttien toistettavuustutkimuksista

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	CFTR-geenialue
PolyTG/PolyT	Yhdisteen DIV*	Introni 9
2183AA>G	Yhdisteen DIV*	Eksoni 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1- Intron3
1154insTC	DIV*	Eksoni 8
I507del	DIV*	Eksoni 11
F508del	DIV*	Eksoni 11
2143delT	DIV*	Eksoni 14
3659delC	DIV*	Eksoni 22
3876delA	DIV*	Eksoni 23
394delTT	DIV homopolymeerialueella*	Eksoni 3
1078delT	DIV homopolymeerialueella*	Eksoni 8
2184delA	DIV homopolymeerialueella*	Eksoni 14
3905insT	DIV homopolymeerialueella*	Eksoni 23
E60X	SNV	Eksoni 3
R75X	SNV	Eksoni 3
G85E	SNV	Eksoni 3
E92X	SNV	Eksoni 4
R117H	SNV	Eksoni 4
Y122X	SNV	Eksoni 4
621+1G>T	SNV	Introni 4
G178R	SNV	Eksoni 5
711+1G>T	SNV	Introni 5
L206W	SNV	Eksoni 6
G330X	SNV	Eksoni 8
R334W	SNV	Eksoni 8
I336K	SNV	Eksoni 8
R347P	SNV	Eksoni 8
R347H	SNV	Eksoni 8
A455E	SNV	Eksoni 10
Q493X	SNV	Eksoni 11
1717-1G>A	SNV	Introni 11
G542X	SNV	Eksoni 12
S549N	SNV	Eksoni 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Eksoni 12
G551D	SNV	Eksoni 12
R553X	SNV	Eksoni 12
R560T	SNV	Eksoni 12
1812-1 G>A	SNV	Introni 12

Variantti (yleinen nimi)	Varianttityyppi	CFTR-geenialue
1898+1G>A	SNV	Introni 13
W846X	SNV	Eksoni 15
2789+5G>A	SNV	Introni 16
3120+1G>A	SNV	Introni 18
3272-26A>G	SNV	Introni 19
Y1092X (C>A)	SNV	Eksoni 20
M1101K	SNV	Eksoni 20
R1158X	SNV	Eksoni 22
R1162X	SNV	Eksoni 22
3849+10kbC>T	SNV	Introni 22
W1282X	SNV	Eksoni 23
N1303K	SNV	Eksoni 24

\* DIV on deleetio-insertiovariantin lyhenne.

## DNA:n eristäminen

Kolme yleisesti käytettyä, kaupallisesti saatavilla olevaa eristämismenetelmää, jotka edustavat eristämistä magneettisesti, alkoholilla saostamista ja piidioksidisuodattimen kolonnieristysmenetelmää, arvioitiin EDTA-antikoaguloitulla kokoverellä. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 14 erillistä verinäytettä, jotka edustivat luonnonvaraista tyyppiä ja kolmea mutanttigenomityyppiä (kolme näytettä F508delillä, yksi näyte I506V:llä ja yksi näyte D110H:lla). Kolme DNA-eristysmenetelmää testattiin itsenäisesti kahdella eri käyttäjällä, joista kumpikin suoritti kolme ajoa eristysmenetelmää kohti. Kukin käyttäjä suoritti jokaisen eristämisen eri päivinä. Eristettyjen gDNA-näytteiden DNA-pitoisuus ja A260-/A280-suhde määritettiin spektrofotometrialla. Kunkin eristysmenetelmän kokonaisotoskoko tässä tutkimuksessa oli 168 (14 näytettä x 2 käyttäjää / eristysmenetelmä x 3 ajoa / käyttäjä x 2 replikaattia / eristetty gDNA-näyte).

Eristysmenetelmä	Testattujen näytteiden määrä	Tunnistusaste	Tarkkuus	Näytteen ensimmäinen tunnistusaste*
Alkoholilla saostaminen	168	100 %	100 %	100 %
Piidioksidisuodattimen kolonnieristysmenetelmä	168	100 %	100 %	100 %
Magneettinen eristäminen	168	100 %	100 %	100 %

\* Prosenttiosuus näytteistä, joissa tunnistusaste  $\geq$  99 % ensimmäisellä ajolla.

## DNA-syöte

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen DNA-tuloalue arvioitiin tekemällä sarjalaimennustutkimus käyttäen 14 edustavaa DNA-näytettä, jotka sisälsivät 16 yksilöllistä KF-varianttia. Jokainen näyte testattiin duplikaation yhdeksällä DNA-tulotasolla, jotka vaihtelivat välillä 1 250–1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng ja 1 ng). Tarkkuuden määrittämistä varten näytteen genotyyppiä verrattiin kaksisuuntaisiin Sanger-sekvensointitietoihin ja deleetioita verrattiin PCR-määritykseen. DNA-tulon ylärajaksi ja alarajaksi todettiin 1 250 ng ja 25 ng, koska niillä oli  $\geq$  95 %:n näytteen ensimmäisen ajon läpäisyaste ilman virheellisiä tunnistuksia (100 %:n tarkkuus ja tunnistusaste).



DNA-tulot 1 250 ng, 250 ng ja 100 ng testattiin edelleen neljällä edustavalla DNA-näytteellä ja vähintään 20 replikaatilla DNA:n tulotasoa kohti kullekin näytteelle ( $n = 4 \times 20 = 80$  näytettä), kun taas 25 ng:n alaraja testattiin 14 näytteellä ja 20 replikaatilla kutakin näytettä kohti ( $n = 14 \times 20 = 280$  näytettä). Tarkkuus ja näytteen ensimmäinen läpäisyaste oli 100 % kaikilla DNA-tulotasoilla.

Tulokset osoittavat, että kystisen fibroosin 139-varianttimääritystä voidaan käyttää DNA-tuloalueella 1 250–25 ng tulosten pysyessä tarkkoina.

## Häiritsevät aineet

Jotta voitiin arvioida kystisen fibroosin 139-varianttimääritykseen häiritsevästi vaikuttavia aineita, määrityksen suoritusta arvioitiin mahdollisten häiriöaineiden läsnäollessa ja puuttuessa. Tutkimuksessa testattiin kahdeksan kokoverinäytettä, joista kolme oli KF-positiivisia näytteitä, joilla oli yksilöivät genotyypit. Neljä endogeenista häiriöainetta (bilirubiini, kolesteroli, hemoglobiini ja triglyseridi) testattiin lisäämällä niitä verinäytteisiin ennen DNA:n eristämistä. Kunkin aineen pitoisuusrajat esitetään seuraavassa taulukossa. Lisäksi verinäytteen otosta (lyhyt menettely) aiheutuvien häiriöiden arvioimiseksi EDTA:ta lisättiin verinäytteisiin. Lisäksi näytteen valmistuksesta johtuvien häiriöiden arvioimiseksi puhdistettuun genomi-DNA:han lisättiin silikasuodattimen kolonieristysmenetelmän lopullinen pesupuskuri.

Kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksessä saavutettiin 100 %:n tunnistusaste kaikissa testatuissa näytteissä ja 100 %:n toistettavuus genotyypin tunnistamisessa näytteiden välillä häiriöaineiden läsnäollessa ja puuttuessa.

Multiplexi-indeksin indeksialukehäiriöiden vaikutuksen arvioimiseksi tehtiin ristikontaminaatiotutkimus, jossa oli mukana kaksi näytettä, joissa kussakin oli yksilöllisiä homotsygoottisia genotyypejä neljässä eri genomipaikassa ja kaksi vastaavaa indeksialuketta. Kontaminaatiotasolla < 40 % ei havaittu muutoksia varianttien tunnistuksessa. Näytteen genotyypistä tuli heterotsygoottinen, kun kontaminaatiotasot olivat  $\geq 40$  %.

Mikään endogeeninen tai eksogeeninen häiriöaine ei aiheuttanut havaittavaa häiriötä.

Testattu aine	Replikaattien kokonaismäärä	Verestä testattu pitoisuus (Yläraja)	Verestä testattu pitoisuus (Alaraja)	Tunnistusaste
Bilirubiini	16	684 $\mu\text{mol/l}$	137 $\mu\text{mol/l}$	100 %
Kolesteroli	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobiini	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglyseridi	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7,0 mg/mL	2,8 mg/ml	100 %

## Näytteen indeksointi

Määrityksessä käytetään näyteindeksialukkeita yksilöllisen viivakoodin luomiseksi kullekin näyte-DNA:lle, jolloin useita näytteitä voidaan yhdistää useisiin sekvenssijoihin. Yhteensä 96 näyteindeksiä testattiin kahdeksalla yksilöllisellä DNA-näytteellä, millä todennettiin määrityksen kyky tehdä johdonmukaisesti genotyypin tunnistus annetusta näytteestä eri indeksointialukkeiden yhdistelmillä. Jokainen näyte testattiin 12 eri indeksointialukkeen yhdistelmällä. Näytetuloksia verrattiin kaksisuuntaisiin Sanger-sekvensointitietoihin kaikista paikoista/varianteista lukuun ottamatta kahta suurta deleetiota, jotka vahvistettiin kaksinkertaisen PCR-määrityksen avulla. Toistettavuus ja tarkkuus olivat 100 % kaikissa näytteen ja indeksin alukeyhdistelmissä.

## Suorituskyvyn vastaavuus Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin 139-varianttimäärityksen kanssa

TruSight-kystisen fibroosin 139-varianttimääritys (TruSight CF139) käyttää samaa kirjaston valmistelutyönkulkua ja reagenssia kuin Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin määritys (MiSeqDx CF139). TruSight CF139 käyttää MiSeqDx-reagenssisarjaa v3, kun taas MiSeqDx CF139 käyttää määritykseen sisältyviä sekvenssoivia reagensseja. TruSight CF139:n ja MiSeqDx CF139:n vastaavuuden osoittamiseksi yhdeksän TruSight CF139 -ajon tuloksia verrattiin yhteen MiSeqDx CF139 -ajoon vertailustandardina. TruSight CF139 -ajot suoritettiin 96

näytteen nopeudella (TruSight CF139:n suurin näytenopeus) ja MiSeqDx CF139:n ajot 48 näytteen nopeudella (MiSeqDx CF139:n suurin näytenopeus). Variaation lähteitä olivat muiden muassa se, että TruSight CF139 -ajoihin sisältyi kolme kirjaston valmistelutapahtumaa (joissa kussakin oli oma erä TruSight-kystistä fibroosia), kolme operaattoria, kolme MiSeqDx-laitetta ja kolme erää MiSeqDx-reagenssisarja v3:a.

TruSight CF139 -ajojen varianttintunnistuksia verrattiin MiSeqDx CF139 -ajon varianttintunnistuksiin. Jokaiseen TruSight CF139 -testiin sisältyi 47 yksilöllistä näytettä, joissa oli 2–3 replikaattia näytettä kohti (95 DNA-näytettä ja 1 NTC per ajo). MiSeqDx CF139 -ajossa samat 47 näytettä sekvensoitiin singletonina (47 DNA-näytettä + 1 NTC ajoa kohti). Näytepaneeli koostui kuolemattomista solulinjoista otetuista Coriell DNA -näytteistä, ja se sisälsi näytteitä, jotka edustivat ACMG 23 -mutaatioiden jokaista alleelia, deleetio-lisäys-variantteja (mukaan lukien lisäys/deleetio homopolymeerialueilla ja lisäys deleetiolla samalla alueella), homotsygoottisia variantteja, heterotsygoottisia yhdistevariantteja, yhtä kohteena olevista suurista deleetioista, yhteistä PolyTG-/PolyT-varianttia, lukuisia yksittäisiä nukleotidivariantteja ja näytteen, jossa ei oltu havaittu variantteja. **Taulukko 19** esittää tulosten yhteenvedon genotyypeittain. **Taulukko 20** esittää määritysten välisen vastaavuuden varianttityypeittain. Määritysten välinen kokonaissopimus (yhteensä) oli > 99,99 %.

Taulukko 19 TruSight CF 139 -varianttimäärityksen varianttien tunnistuskyky verrattuna MiSeqDx CF 139 -varianttimääritykseen

		MiSeqDx CF 139 -varianttimääritys				
		HOM-variantti	HET-variantti	Luonnonvarainen tyyppi	Ei tunnistusta	Yhteensä
TruSight CF 139 -varianttimääritys	HOM-variantti	87	-	-	-	87
	HET-variantti	-	1 098	-	-	1 098
	Luonnonvarainen tyyppi	-	-	113 889	-	113 889
	Ei tunnistusta	-	-	-	-	-
	Yhteensä	87	1 098	113 889	-	115 074

Taulukko 20 TruSight CF 139 -varianttimäärityksen suorituskyky verrattuna MiSeqDx CF 139 -varianttimääritykseen

Varianttityyppi	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Vastaavuus MiSeqDx CF 139 -määrityksen kanssa
SNV	672	0	0	100,00 % (672/672)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	495	0	0	100,00 % (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44 % (17/18)
Ei mitään (luonnonvarainen tyyppi)	113 889	0	0	100,00 % (113 889/113 889)
Yhteensä	115 091	1	0	> 99,99 % (115 091/115 092)

TruSight CF139:n ja MiSeqDx CF139:n välillä havaittiin yksi eriävä tunnistus. Tietty virheellinen tunnistus oli PolyTG/PolyT-variantti. **Taulukko 21** esittää yhteenvedon PolyTG/PolyT-yhtäpitävyydestä. Koska PolyTG/PolyT-genotyyppi ilmoitetaan vain, jos myös R117H-variantti havaitaan, tietojoukko sisältää vain polyTG/PolyT-tunnistukset yhdestä DNA-lähteestä.

Taulukko 21 TruSight CF 139 -varianttimäärityksen PolyTG/PolyT-variantin tunnistuskyky verrattuna MiSeqDx CF 139 -varianttimääritykseen

		MiSeqDx CF 139 -varianttimääritys			Yhteensä
		(TG)12 (T)5 / (TG)10 (T)9	(TG)12 (T)5 / (TG)12 (T)5	Ei tunnistusta	
TruSight CF 139 -varianttimääritys	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	-	1
	Ei tunnistusta	-	-	-	-
	Yhteensä	18	-	-	18

## Kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen suorituskykyominaisuudet

Kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen suorituskykyominaisuudet perustuvat tutkimuksiin, joissa hyödynnettiin kystisen fibroosin 139-variantin MiSeqDx-määritystä. TruSight- ja MiSeqDx-määritysten vastaavuus käsitellään kohdassa [Suorituskyvyn vastaavuus Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen kanssa sivulla 90](#).

## Tarkkuus

Kystisen fibroosin kliinisen sekvenssoinnin määrityksen tarkkuus arvioitiin 500 näytteellä, jotka edustivat laajaa joukkoa CFTR-variantteja neljästä eri lähteestä. Tarkkuustietojen ensisijainen lähde oli kliininen tarkkuustutkimus, joka tehtiin 366 näytteen paneelilla. Suurin osa (n = 355) näytteistä koostui ihmisverestä eristetyistä arkistoiduista, anonymisoiduista kliinisistä gDNA-näytteistä. Loput 11 näytettä saatiin kaupallisesti saatavilla olevista solulinjanäytteiden kirjastoista.

Tämän tutkimuksen tietoja täydennettiin tarkkuustiedoilla, jotka saatiin 68 toistettavuustutkimuksessa arvioidusta solulinjanäytteestä, 14 kliinisellä näytteellä eristämismenetelmän arvioinnin analyysitutkimuksesta ja 52 synteettisellä plasmidinäytteellä. Synteettiset plasmidit suunniteltiin sisältämään harvinaisten varianttien genomikonteksti, ja ne sisälsivät 1–10 varianttia saman rakenteen sisällä. Ne lineaarisoiitiin, laimennettiin genomi-DNA:ta vastaaviksi kopionumeroiksi ja sekoitettiin ihmisen genomi-DNA-näytteisiin, jotka olivat luonnonvaraista genotyyppiä, vastaavilla kopionumeroilla jäljittelemään heterotsygoottista näytettä.

Kystisen fibroosin kliinisessä sekvenssimäärityksessä verrattiin yhteensä 5 206 paikkaa Sangerin kaksisuuntaisen sekvenssoinnin ja PCR-testauksen vertailumenetelmiin. SNV-kohdan/pienen indelikohdan genotyyppityksen tuloksia, mukaan lukien PolyTG-/PolyT-alue, verrattiin Sangerin kaksisuuntaiseen sekvenssianalyysiin.

Paneelin kahden suuren deleetion vertailumenetelmänä käytettiin kahta validoitua PCR-pohjaista määritystä. Jokaisessa kahdenneetussa PCR-määrityksessä hyödynnettiin kahta alukesarjaa, jotka erottavat toisistaan luonnonvaraisen tyypin, heterotsygoottiset ja homotsygoottiset genotyypit. Toinen alukesarjoista suunniteltiin olemaan deleetion murtumapisteiden vieressä, kun taas toinen monisti deleetion sisäistä aluetta. Nämä kaksi tuotetta havaittiin koon erottelulla agarosigeelissä. PCR-määritykset validoitiin käyttämällä 28 näytteen (22 näytettä kutakin deleetiota varten) paneelia, joka koostui solulinjoista ja verestä saaduista genomi-DNA-näytteistä ja synteettisistä plasmideista, jotka kattoivat WT-, HET- ja HOM-genotyypit kunkin suuren deleetion osalta. PCR-määrityksillä vahvistettiin olevan 100 %:n spesifisyys ja toistettavuus kaikkien testattujen näytteiden osalta arvioimalla PCR-tuotteet agarosigeelillä. PCR-määritysten tarkkuus vahvistettiin Sanger-sekvenssoinnilla, ja tarkkuuden todettiin olevan 100 % kaikissa näytteissä.

Tarkkuus määritettiin kullekin genotyyppille kolmella tilastollisella menettelyllä. Positiivinen vastaavuus (PA) laskettiin kullekin variantin genotyyppille jakamalla vastaavien varianttunnistusten näytteiden määrä näytteiden kokonaismäärällä niin, että kyseinen variantti on yksilöity vertailumenetelmillä. Negatiivinen vastaavuus (NA)

laskettiin kaikissa luonnonvaraisen tyypin (WT) paikoissa jakamalla yhtäpitävien WT-paikkojen määrä vertailumenetelmällä määritellyllä WT-paikkojen kokonaismäärällä. Kokonaisvastaavuus (OA) laskettiin kaikissa raportoiduissa paikoissa jakamalla yhtäpitävien WT-paikkojen ja varianttipaikkojen määrä vertailumenetelmällä määritellyllä paikkojen raportoidulla määrällä.

Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen genotyyppitason PA oli 99,66 %, mukaan lukien PolyTG-/PolyT-variantit (100 % lukuun ottamatta PolyTG-/PolyT-variantteja). Kaikkien WT-paikkojen NA oli > 99,99 %, ja kaikkien raportoitujen paikkojen OA oli > 99,99 %.

Taulukko 22 Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen yleistarkkuus

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	–	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 <sup>#</sup>	98,60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100



Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1.6kb A>G	c.1679+1.6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 <sup>Y</sup>	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100

Genotyyppi (yleinen nimi/cDNA- nimi/koordinaatti)	cDNA-nimi	Varianttityyppi	CFTR- geenialue (hg19)	Positiiviset tunnistukset (variantit)			Ei tunnistuksia*	Vääriä tunnistuksia	Positiivinen vastaavuus
				Kliiniset näytteet	Solulinjan näytteet	Synteettiset näytteet			
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
Kaikki variantit yhteensä (PA)†					2 072		3	4	99,66
Yhteensä kaikki WT:t (NA)					2 600 928		1	2 <sup>§</sup>	> 99,99
Kaikki variantit ja WT:t yhteensä (OA)					2 603 000		4	6	> 99,99

DIV on deleetio-insertiovariantin lyhenne.

\* Näytteitä ei testattu uudelleen.

^ Ohjelmisto ei raportoi tämän genomikoordinaatin cDNA-nimeä.

\*\* Sangerin raportissa P205S-variantti listattiin heterotsygoottiseksi kliinisen näytteen osalta. Sangerin jäljitystietojen tarkastelu osoitti kuitenkin, että variantti oli itse asiassa homotsygoottinen ja että se oli raportoitu virheellisesti. MiSeqDx raportoi variantin homotsygoottiseksi.

# Yksi ei-vastaava tulos oli toistettavuustutkimuksesta. Näytteen PolyTG/PolyT-tulos oli yhtäpitävä kaikissa 18 replikaatissa, mutta ristiriitainen Sangerin kaksisuuntaisen sekvensoinnin osalta.

‡ Alkuperäinen synteettinen heterotsygoottinen näyte todettiin väärin valmistelluksi. Kun se myöhemmin testattiin sen jälkeen, kun näyte oli valmisteltu uudelleen käyttäen samaa plasmidia, se havaittiin.

† PA pois lukien PolyTG-/PolyT-tunnistukset oli 100 %.

§ Synteettinen heterotsygoottinen näyte eksoni 8:lle ilmoitettiin heterotsygoottiseksi variantille CFTR dele22, 23. Lisätutkimukset paljastivat, että tämä tulos johtui todennäköisesti lievistä kontaminaatiosta. Lisäksi toisen näytteen osalta Sanger-alkukeet eivät täysin havainneet varianttia Q1463Q johtuen varianttipaikan ylä- ja alavirtaussunnan indeleistä.

Taulukko 23 Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen tarkkuus PolyTG-/PolyT-variantin suhteen

PolyTGPolyT- genotyyppi	Kliinisten näytteiden määrä	Solulinjan näytteiden määrä	Synteettisten näytteiden määrä	Väriiden tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä*	Tarkkuus, %
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50,00
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100

PolyTGPolyT- genotyyppi	Kliinisten näytteiden määrä	Solulinjan näytteiden määrä	Synteettisten näytteiden määrä	Väärin tunnistusten määrä	Ei tunnistuksia, määrä*	Tarkkuus, %
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
<b>Yhteensä</b>		<b>448</b>		<b>4</b>	<b>3</b>	<b>98,44</b>

\* Näytteitä ei testattu uudelleen.

^ Yksi ei-vastaava tulos oli lisääntymistutkimuksesta. Näytteen PolyTG/PolyT-tulos oli yhtäpitävä kaikissa 18 replikaatissa, mutta ristiriitainen Sangerin kaksisuuntaisen sekvensoinnin osalta.

## Toistettavuus

Kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen toistettavuus määritettiin sokkotutkimuksen avulla käyttäen kolmea tutkimuskeskusta ja kahta käyttäjää kussakin keskuksessa. Kukin käyttäjä testasi kussakin testipaikassa kaksi hyvin määritettyä 46 näytteen paneelia niin että saatiin yhteensä 276 näytetulosta käyttäjää kohden. Paneeli sisälsi genomi-DNA:n sekoituksen lymfoblastoidisolulinjoista, joissa oli tunnettuja mutaatioita *CFTR*-geenissä, sekä leukosyytitöntä verta, jossa oli lisättyä lymfoblastoidisolulinjoja, joilla oli tunnettuja mutaatioita *CFTR*-geenissä. Verinäytteet otettiin, jotta määrityksen työnkulun ensisijaisena syötteenä käytettävän gDNA:n valmistelussa käytetyt eristämisvaiheet voitiin sisällyttää.

Näytteen läpäisyaste, joka määriteltiin laadunvarmistusmittareiden läpäisevien näytteiden määränä ensimmäisellä yrityksellä, oli 99,7 %. Kaikki tulokset perustuvat alkutestaukseen.

Kaikkien varianttien, myös PolyTG/PolyT- variantin, genotyyppitason PA oli 99,22 % ja ilman PolyTG-/PolyT- varianttia 99,60 %. Kaikkien WT-paikkojen NA oli 99,70 % ja kaikkien ilmoitettujen paikkojen OA oli 99,70 %. PolyTG./PolyT-variantin PA oli 97,83 %.

Taulukko 24 Kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen toistettavuus (pois lukien PolyTG/PolyT-variantit)

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100



Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
3	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
4	c.1408G>A	V470M	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	5	6	6	1	0	94,44
4	c.2052delA	2184delA	6	18	5	6	6	1	0	94,44
5	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.224G>A	R75Q	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.2562T>G	T854T	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.3472C>T	R1158X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.366T>A	Y122X	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
5	c.625G>T	A209S	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
10	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
10	c.3140-26A>G	3272-26A>G	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
10	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
11, 39	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2002C>T	R668C	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
15	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
16	c.3080T>C	I1027T	6	18	6	6	6	0	0	100
17, 41	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
17, 41	c.3528delC	3659delC	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
23	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
23	c.3276C>A	Y1092X (C>A)	6	18	6	6	6	0	0	100
24, 45	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.3909C>G	N1303K	12	36	12	12	12	0	0	100
24, 45	c.4046G>A	G1349D	12	36	12	12	12	0	0	100
25	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
30	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.1585-1G>A	1717-1G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
31	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
38	c.1727G>C	G576A	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2002C>T	R668C	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2057C>A	S686Y	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastaa- vuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
61	c.2260G>A	V754M	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100



Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastaa- vuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
71	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Näyte	HGVS-nimi (tai paikka, jos HGVS:ää ei ole)	Variantin nimi	Tulokset yhteensä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä* (kaikki testipaikat)		Vastaa- vuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia <sup>€</sup>	Vääriä tunnistuksia	
83	c.-4G>C	11720145	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
83	c.350G>A	R117H	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
84	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
Kaikki variantit yhteensä (PA)** (mukaan lukien PolyTG- /PolyT-tiedot <a href="#">Taulukko 25</a> )			2 580	7 740	2 562	2 553	2 565	37	23	99,22
Yhteensä kaikki WT:t (NA)			2 871 132	8 613 396	2 865 930	2 855 526	2 865 932	26 006	2	99,70
Kaikki variantit ja WT:t yhteensä (OA)			2 873 712	8 621 136	2 868 492	2 858 079	2 868 497	26 043	25	99,70

<sup>€</sup> Näytteitä ei testattu uudelleen.

<sup>^</sup> Yhdellä replikaatilla näytteistä 5 ja 75 oli 0 %:n tunnistusaste. Lisätutkimukset osoittivat, että näytteitä ei todennäköisesti ollut lisätty näytelevylle ennen kirjaston valmistelua.

<sup>\*</sup> Tarkastelun yhteydessä kävi ilmi, että käyttäjä vaihtoi todennäköisesti keskenään näytteet 9 ja 10 ennen kirjaston valmistelua.

<sup>\*\*</sup> PolyTG-/PolyT-variantit pois lukien PA oli 99,60 %.

Taulukko 25 PolyTG-/PolyT-toistettavuus kystisen fibroosin kliinisen sekvenssimäärityksen yhteydessä

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaa- vuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
A	1	(TG)12(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	2	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	3	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
A	4	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
A	5	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	6	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	7	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	8	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	9	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	10	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	11, 39	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	12, 40	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	13	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	14	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	15	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
A	16	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	17, 41	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	18, 42	(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	12	36	12	12	12	0	0	100 %

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
A	19	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	20, 43	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22 %
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78 %
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
A	34	(TG)11(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	35	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	36	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	37	(TG)11(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
A	38	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	47, 85	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	48, 86	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	11	11	12	2	0	94,44 %
B	49, 87	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	50, 88	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)7	12	36	12	12	12	0	0	100 %
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12 (T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %

Paneeli	Näyte	Genotyyppi	Tulosten määrä		Vastaavat tunnistukset			Yhteensä, kaikki testipaikat		Vastaavuus, %
			Testipaikkaa kohden	Kaikki testipaikat	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	Ei tunnistuksia	Vääriä tunnistuksia	
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89 %
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44 %
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44 %
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11 (T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0 %
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	6	18	6	6	6	0	0	100 %
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10 (T)7	6	18	6	6	6	0	0	100 %
PolyTG-/PolyT-variantit (PA)			552	1 656	537	540	543	17	19	97,83 %

\* Kaikki 18 näytettä olivat keskenään yhtäpitäviä, mutta ristiriitaisia Sangerin kaksisuuntaisen sekvensoinnin suhteen.



## DNA:n eristäminen

Kolme yleisesti käytettyä, kaupallisesti saatavilla olevaa eristämismenetelmää, jotka edustavat eristämistä magneettisesti, alkoholilla saostamista ja piidioksidisuodattimen kolonieristysmenetelmää, arvioitiin K<sub>2</sub>EDTA-antikoaguloidulla kokoverellä. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 14 verinäytettä. Kaksi oli luonnonvaraista tyyppiä, kun taas muissa näytteissä oli yksilöllisiä genotyyppiä, jotka edustivat yhdeksää eri varianttia, mukaan lukien sekä yleiset että harvinaiset variantit. PolyTG/polyT-varianttia varten otettiin näytteet, joissa (T)5-9 ja (TG)10-12 oli mukana. Kolme DNA-eristysmenetelmää testattiin itsenäisesti kahdella eri käyttäjällä, joista kumpikin suoritti kolme ajoa eristysmenetelmää kohti. Kukin käyttäjä suoritti jokaisen eristämisen eri päivinä. Eristettyjen gDNA-näytteiden DNA-pitoisuus ja A260-/A280-suhde määritettiin spektrofotometrialla. Kunkin eristysmenetelmän kokonaisotoskoko tässä tutkimuksessa oli 168 (14 näytettä x 2 käyttäjää / eristysmenetelmä x 3 ajoa / käyttäjä x 2 replikaattia / eristetty gDNA-näyte).

Eristysmenetelmä	Testattujen näytteiden määrä	Tunnistusaste	Tarkkuus	Näytteen ensimmäinen tunnistusaste*
Alkoholilla saostaminen	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Piidioksidisuodattimen kolonieristysmenetelmä	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %
Magneettinen eristäminen	168	> 99,99 %	> 99,99 %	100 %

\* Prosenttiosuus näytteistä, joissa tunnistusaste > 99 % ensimmäisellä ajolla.

## DNA-syöte

Kystisen fibroosin klinisen sekvensoinnin määrittämisen DNA-tuloalue arvioitiin tekemällä sarjalaimennustutkimus käyttäen 14 edustavaa DNA-näytettä, jotka sisälsivät 16 yksilöllistä KF-varianttia. Jokainen näyte testattiin duplikaation 9 DNA-tulotasolla, jotka vaihtelivat välillä 1 250–1 ng (1 250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng ja 1 ng). Tarkkuuden määrittämistä varten näytteen genotyyppiä verrattiin kaksisuuntaisiin Sanger-sekvensointitietoihin ja deleetioita verrattiin PCR-määrittämiseen. DNA-tulon ylärajaksi ja alarajaksi todettiin 1 250 ng ja 25 ng, koska niillä oli  $\geq 95$  %:n näytteen ensimmäisen ajon läpäisyaste ilman virheellisiä tunnistuksia (100 %:n tarkkuus ja tunnistusaste).

DNA-tulot 1 250 ng, 250 ng ja 100 ng testattiin edelleen neljällä edustavalla DNA-näytteellä ja vähintään 20 replikaatilla DNA:n tulotasoa kohti kullekin näytteelle ( $n = 4 \times 20 = 80$  näytettä), kun taas 25 ng:n alaraja testattiin 14 näytteellä ja 20 replikaatilla kutakin näytettä kohti ( $n = 14 \times 20 = 280$  näytettä). Tarkkuus ja näytteen ensimmäinen läpäisyaste oli 100 % kaikilla DNA-tulotasolla.

## Häiritsevät aineet

Jotta voitiin arvioida Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin järjestelmään häiritsevästi vaikuttavia aineita, määrittämisen suoritus arvioitiin mahdollisten häiriöaineiden läsnäollessa ja puuttuessa. Tutkimuksessa testattiin kuusitoista kokoverinäytettä, joilla oli yksilölliset genotyypit. Neljä endogeenistä häiriöainetta (bilirubiini, kolesteroli, hemoglobiini ja triglyseridejä) testattiin lisäämällä niitä verinäytteisiin ennen DNA:n eristämistä. Kunkin aineen pitoisuusrajat esitetään seuraavassa taulukossa. Lisäksi verinäytteen otosta (lyhyt menettely) aiheutuvien häiriöiden arvioimiseksi EDTA:ta lisättiin verinäytteisiin. Lisäksi näytteen valmistuksesta johtuvien häiriöiden arvioimiseksi puhdistettuun genomi-DNA:han lisättiin silikasuolettimen kolonieristysmenetelmän lopullinen pesupuskuri.

Kystisen fibroosin klinisessä sekvensointimäärittämisessä saavutettiin 100 %:n tunnistusaste kaikissa testatuissa näytteissä ja 100 %:n toistettavuus genotyypin tunnistamisessa näytteiden välillä häiriöaineiden läsnäollessa ja puuttuessa. Mikään endogeeninen tai eksogeeninen häiriöaine ei aiheuttanut havaittavaa häiriötä.

Multiplexi-indeksin indeksialuehäiriöiden vaikutuksen arvioimiseksi tehtiin ristikontaminaatiotutkimus, jossa oli mukana kaksi näytettä, joissa kussakin oli yksilöllisiä homotsygoottisia genotyyppiä neljässä eri genomipaikassa ja kaksi vastaavaa indeksialuketta. Kontaminaatiotasolla < 40 % ei havaittu muutoksia varianttien tunnistuksessa. Näytteen genotyypistä tuli heterotsygoottinen, kun kontaminaatiotasot olivat  $\geq 40$  %.

Testattu aine	Replikaattien kokonaismäärä	Verestä testattu pitoisuus (Yläraja)	Verestä testattu pitoisuus (Alaraja)	Tunnistusaste
Bilirubiini	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Kolesteroli	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobiini	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglyseridi	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7,0 mg/mL	2,8 mg/ml	100 %

## Suorituskyvyn vastaavuus Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin kliinisen sekvensointimäärityksen kanssa

TruSight-kystisen fibroosin kliininen sekvensointimääritys (TruSight CFCS) käyttää samaa kirjaston valmistelutyönkulkua ja reagenssia kuin Illumina MiSeqDx -kystisen fibroosin määritys (MiSeqDx CFCS). TruSight CFCS käyttää MiSeqDx-reagenssisarjaa v3, kun taas MiSeqDx CFCS käyttää määritykseen sisältyviä sekvensoivia reagensseja. TruSight CFCS:n ja MiSeqDx CF139:n vastaavuuden osoittamiseksi yhdeksän TruSight CFCS -ajon tuloksia verrattiin yhteen MiSeqDx CFCS -ajoon vertailustandardina. TruSight CFCS -ajot suoritettiin 96 näytteen nopeudella (TruSight CFCS:n suurin näytenopeus) ja MiSeqDx CFCS -ajot 48 näytteen nopeudella (MiSeqDx CFCS:n suurin näytenopeus). Variaation lähteitä olivat muiden muassa se, että TruSight CFCS -ajoihin sisältyi kolme kirjaston valmistelutapahtumaa (joissa kussakin oli oma erä TruSight-kystistä fibroosia), kolme operaattoria, kolme MiSeqDx-laitetta ja kolme erää MiSeqDx-reagenssisarjaa v3:a.

TruSight CFCS -ajojen varianttintunnistuksia verrattiin MiSeqDx CFCS -ajon varianttintunnistuksiin. Jokaiseen TruSight CFCS -testiin sisältyi 47 yksilöllistä näytettä, joissa oli 2–3 replikaattia näytettä kohti (95 DNA-näytettä ja 1 NTC per ajo). MiSeqDx CFCS -ajossa samat 47 näytettä sekvensoitiin singletonina (47 DNA-näytettä + 1 NTC ajoa kohti). Näytepaneeli koostui kuolemattomista solulinjoista otetuista Coriell DNA -näytteistä, ja se sisälsi näytteitä, jotka edustivat ACMG 23 -mutaatioiden jokaista alleelia, deleetio-lisäys-variantteja (mukaan lukien lisäys/deleetio homopolymeerialueilla ja lisäys deleetiolla samalla alueella), homotsygoottisia variantteja, heterotsygoottisia yhdistevariantteja, yhtä kohteena olevista suurista deleetioista, PolyTG-/PolyT-variantteja, yksittäisiä nukleotidivariantteja ja näytteen, jossa ei oltu havaittu variantteja. **Taulukko 26** esittää tulosten yhteenvedon genotyypeittäin. **Taulukko 27** esittää määritysten välisen vastaavuuden varianttityypeittäin. Määritysten välinen kokonaissopimus (yhteensä) oli > 99,99 %.

Taulukko 26 TruSight CFCS -varianttimäärityksen varianttien tunnistuskyky verrattuna MiSeqDx CFCS -varianttimääritykseen

		Kliininen MiSeqDx CF -määritys				
		HOM-variantti	HET-variantti	Luonnonvarainen tyyppi	Ei tunnistusta	Yhteensä
Kliininen TruSight CF -määritys	HOM-variantti	551	-	-	-	551
	HET-variantti	-	2 664	-	-	2 664
	Luonnonvarainen tyyppi	-	-	4 426 182	-	4 426 182
	Ei tunnistusta	-	-	58	-	58
	Yhteensä	551	2 664	4 426 420	-	4 429 455

Taulukko 27 TruSight CF -kliinisen sekvensointimäärityksen variantin tunnistuskyky verrattuna MiSeqDx CF -kliiniseen sekvensointimääritykseen varianttityypeittäin

Varianttityyppi	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Vastaavuus kliinisen MiSeqDx CF -sekvensointimäärityksen kanssa
SNV	2 684	0	0	100,00 % (2 684/2 684)
DEL	18	0	0	100,00 % (18/18)
DIV	513	0	0	100,00 % (513/513)
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88 % (847/851)
Ei mitään (luonnonvarainen tyyppi)	4 426 182	0	58	100,00 % (4 426 182/4 426 240)
<b>Yhteensä</b>	<b>4 430 244</b>	<b>1</b>	<b>61</b>	<b>&gt; 99,99 % (4 430 244/4 430 306)</b>

TruSight CFCS:n ja MiSeqDx CFCS:n välillä havaittiin yksi eriävä tunnistus. Tietty virheellinen tunnistus oli PolyTG/PolyT-variantti. Yhteenveto PolyTG/PolyT-yhtäpitävyydestä on [Taulukko 28](#) sivulla 92.

Taulukko 28 TruSight CF -kliinisen sekvensointimäärityksen PolyTG/PolyT-variantin tunnistuskyky verrattuna MiSeqDx CF -kliiniseen sekvensointimääritykseen

		MiSeqDx CF MiSeqDx CF -kliinisen sekvensointimäärityksen taulukko												
		(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)10 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)5	(TG)10 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)10 (T)9/ (TG)10 (T)9	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)10 (T)9	(TG)11 (T)7/ (TG)11 (T)7	(TG)11 (T)7/ (TG)12 (T)7	(TG)12 (T)5/ (TG)12 (T)5	Ei tunnistusta	Yhteensä
TruSight CF - kliininen määritys	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)9	-	189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	189
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	18
	(TG)10(T)9/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	72
	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	17
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)7	-	-	-	-	-	-	126	-	-	-	-	-	126
	(TG)11(T)7/ (TG)10(T)9	-	-	-	-	-	-	-	249	-	-	-	-	249
	(TG)11(T)7/ (TG)11(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	72	-	-	-	72
	(TG)11(T)7/ (TG)12(T)7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	36
	(TG)12(T)5/ (TG)12(T)5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	Ei tunnistusta	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
Yhteensä	50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851	

## Lähdeviitteet

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387–391.
- 2 Committee on Genetics (genetiikan komitea). (Huhtikuu 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations – Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Stemen DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Stemen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, toimittajat. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Saatavilla osoitteessa [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250). [Verkkoversio] Päivitetty 19.2.2008.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Saatavilla osoitteessa [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). [Verkkoversio] 7.12.2012.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4–S14.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Saatavilla osoitteessa [www.genet.sickkids.on.ca/app](http://www.genet.sickkids.on.ca/app). [Verkkoversio] Elokuu 2013.
- 10 Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
- 11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Saatavilla osoitteessa [www.cftr2.org](http://www.cftr2.org). [Verkkoversio] Elokuu 2013.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) -projekti. Saatavilla osoitteessa [www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf](http://www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf). [Verkkoversio] Esittäjänä Garry Cutting CFTR2-projektin edustajana 25. Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) -konferenssissa, sponsorina Cystic Fibrosis Foundation. 4.11.2011. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
- 14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
- 15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.
- 16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
- 17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (vuoden 2008 versio, muokattu 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
- 18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

## Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanumero 1000000097720 v03	Toukokuu 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koko asiakirjan sisältö päivitetty MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (luettelonumero 20063860) -reagenssisarjan ja sen työnkulun huomioimiseksi.</li> <li>• Toimenpidehuomautukset-osioon luotu Näytteiden valmistelu -alaoisio, johon on siirretty osion DNA:n erottamista ja kvantitointia koskevat tiedot.</li> <li>• Varoitukset ja varotoimet -osioon lisätty ilmoitus, joka koskee tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista tapahtumista ilmoittamista Illuminalle ja jäsenvaltion toimivaltaiselle viranomaiselle.</li> <li>• Tuotteiden merkinnät -osioon lisätty ilmoitus, joka koskee tiivistelmää turvallisuudesta ja suorituskyvystä ja Basic UDI-DI -tunnistetta.</li> <li>• <sup>TM</sup>-symbolin paikka korjattu tuotteen yleiskuvauksessa.</li> <li>• Huomautus-, huomio- ja varoituskuvakkeet päivitetty.</li> <li>• Versiohistoriataulukko täydennetty.</li> </ul>
Asiakirjanumero 1000000097720 v02	Elokuu 2021	Lisätty versiohistoriataulukko. Päivitetty valtuutetun EU-edustajan osoite.
Asiakirjanumero 1000000097720 v01	Kesäkuu 2020	Lisätty uusi osanumero 20037124 MiSeqDx Reagent Kit v3:lle.
Asiakirjanumero 1000000097720 v00	Maaliskuu 2020	Ensimmäinen versio.

## Patentit ja tavaramerkit

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

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

AMPure, Beckman ja Beckman Coulter ovat Beckman Coulter, Inc. -yhtiön tavaramerkkejä tai rekisteröityjä tavaramerkkejä.

## Yhteystiedot



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



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

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

## Tuotteiden merkinnät

Katso tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset osoitteesta [support.illumina.com](https://support.illumina.com). Tiivistelmä turvallisuudesta ja suorituskyvystä (SSP, Summary of Safety and Performance) on eurooppalaisen lääkinnällisten laitteiden tietokannan (Eudamed) käyttöönoton jälkeen osoitteessa <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Se on yhdistetty yksilölliseen laitemallin tunnisteseen (Basic UDI-DI, Basic Unique Device Identifier - Device Identifier) (0081627002CYSTFIB8C).