

# Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Cystic Fibrosis do oznaczania wariantów genu mukowiscydozy

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO

Nr kat. 20036925: 1-4 przebiegów, do 96 próbek na zestaw

## Informacje ogólne o produkcie

TruSight™ Cystic Fibrosis Library Prep™ to zestaw do przygotowywania biblioteki współpracujący z testem TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testem TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy.

## Przeznaczenie testu TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

Test TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy (wcześniej znany jako test Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy) jest systemem do jakościowej diagnostyki *in vitro* stosowanym do jednoczesnego wykrywania 139 istotnych klinicznie mutacji wywołujących mukowiscydozę i wariantów genu błonowego regulatora przewodnictwa związanego z mukowiscydozą (ang. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) w genomowym DNA wyodrębnionym z próbek ludzkiej pełnej krwi obwodowej. Wśród wariantów są te zalecone w 2004 roku przez Amerykańskie Kolegium Genetyki Medycznej (ang. American College of Medical Genetics, ACMG)<sup>1</sup> oraz w 2011 roku przez Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ang. American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)<sup>2</sup>. Test jest przeznaczony do badań przesiewowych w kierunku nosicielstwa u osób dorosłych w wieku rozrodczym, diagnostycznych badań potwierdzających u noworodków i dzieci oraz jako test wspomagający w diagnozowaniu podejrzenia mukowiscydozy. Wyniki testu musi przeanalizować licencjonowany kliniczny genetyk molekularny lub inna kompetentna osoba. Należy je interpretować łącznie z innymi dostępnymi informacjami laboratoryjnymi i klinicznymi.

Niniejszy test nie jest przeznaczony do badań przesiewowych noworodków, diagnostyki prenatalnej, badań preimplantacyjnych ani samodzielnych badań diagnostycznych.

Test jest przeznaczony do stosowania w aparacie Illumina MiSeqDx.

## Przeznaczenie testu TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Test TruSight do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy (wcześniej znany jako oznaczenie sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy za pomocą aparatu MiSeqDx firmy Illumina) jest diagnostycznym systemem *in vitro* opartym na ukierunkowanym sekwencjonowaniu, za pomocą którego przeprowadzane jest ponowne sekwencjonowanie regionów kodowania białek oraz połączeń intron-ekson genu błonowego regulatora przewodnictwa związanego z mukowiscydozą (CFTR) w genomowym DNA wyizolowanym z próbek ludzkiej obwodowej krwi pełnej pobranych do probówek z K<sub>2</sub>EDTA. Test wykrywa warianty pojedynczego nukleotydu oraz niewielkie polimorfizmy typu indel w obrębie sekwencjonowanego regionu, a dodatkowo zapewnia raporty dotyczące dwóch głębokich mutacji intronowych oraz dwóch dużych delecji. Test jest przeznaczony do stosowania w aparacie Illumina MiSeqDx.

Test służy jako narzędzie pomocnicze w diagnozowaniu osób z podejrzeniem mukowiscydozy. Zastosowanie tego testu jest najbardziej uzasadnione, gdy pacjent wykazuje nietypowe objawy mukowiscydozy lub gdy za pomocą innych paneli nie zidentyfikowano dwóch mutacji powodujących chorobę. Wyniki testu musi przeanalizować licencjonowany kliniczny genetyk molekularny lub inna kompetentna osoba. Należy je interpretować łącznie z innymi dostępnymi informacjami medycznymi, w tym o objawach klinicznych, wynikami innych testów diagnostycznych oraz wywiadem rodzinnym.

Zgodnie z przeznaczeniem test nie stanowi jedyne narzędzia diagnostycznego. Nie służy do diagnostyki prenatalnej, badań preimplantacyjnych, badań przesiewowych nosicieli, badań przesiewowych noworodków ani przesiewowych badań populacyjnych.

## Informacje o mukowiscydozie

### Opis kliniczny

Mukowiscydoza jest jedną z najczęstszych chorób genetycznych w świecie zachodnim i jednym z najpowszechniejszych zagrażających życiu zaburzeń autosomalnych recesywnych w białej populacji osób niebędących Latynosami<sup>3-7</sup>. Mukowiscydoza wpływa na lepkość wydzielanego śluzu, a także na nabłonki dróg oddechowych, trzustki, jelit, układu wątrobowo-żółciowego, męskiego układu płciowego oraz gruczołów potowych, co czyni ją złożoną chorobą wielonarządową i wieloukładową<sup>4-6</sup>, przy czym układem narządów najczęściej powiązanych z zachorowalnością i śmiertelnością są płuca<sup>8</sup>. W wielu przypadkach wystąpienie niedoborów żywieniowych zapowiada postęp mukowiscydozy w płucach. Kluczowym celem aktualnie podejmowanych działań interwencyjnych jest wczesna diagnoza poprzez badania przesiewowe noworodków<sup>7</sup>, co umożliwia dostęp w odpowiednim czasie do niezbędnych usług medycznych i pozwala uzyskać najlepszy możliwy wynik leczenia dla pacjentów z tą chorobą<sup>4,7</sup>. Mimo różnic w przeżywalności pomiędzy płciami, całkowita mediana przeżywalności, która jest wyższa u mężczyzn, wynosi w Stanach Zjednoczonych 38,3 lat<sup>8</sup>.

### Warianty CFTR i ich występowanie

Gen błonowego regulatora przewodnictwa związanego z mukowiscydozą (CFTR) zidentyfikowany w 1989 roku jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7 i zawiera 27 kodujących eksonów rozłożonych na obszarze 230 kb<sup>4</sup>. mRNA o wielkości 6,5 kb wytwarzane przez prawidłowy allel koduje CFTR, będące integralnym białkiem błony komórkowej utworzonym przez 1490 reszt aminokwasowych i funkcjonującym jako regulowany kanał chlorkowy w komórkach nabłonkowych wielu narządów<sup>4,5</sup>. Aktualnie opisanych zostało ponad 1900 wariantów, z których większość stanowi mutacje punktowe<sup>9</sup>. Najpowszechniejszym wariantem CFTR jest allel F508del<sup>5</sup>, który odpowiada za blisko 70% wszystkich wariantów CFTR<sup>3</sup>. Natomiast inne powszechne warianty CFTR często skutkują fenotypem mukowiscydozy i innymi zaburzeniami związanymi z białkiem CFTR<sup>3-5</sup>.

Częstość występowania mukowiscydozy szacuje się na jeden przypadek na 2000-4000 urodzeń dzieci żywych, a chorobowość w populacji Stanów Zjednoczonych wynosi około 30 000 osób<sup>4</sup>. Choroba występuje we wszystkich grupach etnicznych i rasowych z różną częstotliwością: jeden przypadek na 3000 osób rasy białej, jeden na 9200 Latynosów, jeden na 10 900 rdzennych Amerykanów, jeden na 15 000 Afroamerykanów oraz jeden na 31 000 Amerykanów pochodzenia azjatyckiego<sup>4,6</sup>. Aktualne szacunki dotyczące liczby nosicieli mutacji CFTR w Stanach Zjednoczonych według pochodzenia etnicznego, przeprowadzone na podstawie grupy 364 890 osób skierowanych na badanie w kierunku nosicielstwa bez mukowiscydozy w wywiadzie rodzinnym, zawiera [Tabela 1](#).

Tabela 1 Ogólna częstość występowania nosicielstwa mutacji genu mukowiscydozy w różnych grupach etnicznych w Stanach Zjednoczonych<sup>10</sup>

Grupa etniczna	Obserwowana częstość nosicielstwa
Afroamerykanie	1 na 84
Żydzi aszkenazyjscy	1 na 29
Azjaci	1 na 242
Biali (rasa kaukaska)	1 na 28
Latynosi	1 na 59
Żydzi	1 na 32
Azjaci (Bliski Wschód)	1 na 91
Rdzenni Amerykanie	1 na 70
Azjaci (Azja Południowa)	1 na 118
Inni	1 na 111
Inni: pochodzenie z > 1 grupy etnicznej	1 na 34
Inni: pochodzenie częściowo afroamerykańskie	1 na 56
Inni: pochodzenie częściowo kaukaskie	1 na 32
Inni: pochodzenie częściowo latynoskie	1 na 51
Nie podano	1 na 37
Wszyscy ogółem	1 na 38

## Podsumowanie i wyjaśnienia dotyczące testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

### Informacje ogólne o projekcie CFTR2

Projekt CFTR2 jest inicjatywą międzynarodową prowadzoną przez zespół badaczy i lekarzy. Finansowany jest przez Narodowy Instytut Zdrowia (ang. National Institute of Health) oraz Amerykańską Fundację Mukowiscydozy (ang. Cystic Fibrosis Foundation, CFF)<sup>11,12</sup>. Celem projektu CFTR2 jest dostarczenie kompleksowych i zweryfikowanych przez ekspertów danych czynnościowych i klinicznych na temat wariantów CFTR. Chcąc zweryfikować klinicznie wszystkie warianty genu mukowiscydozy przy częstotliwości alleli na poziomie 0,01% i wyższym, 25 ośrodków rejestracyjnych i klinicznych z całego świata<sup>13</sup>, które zajmują się mukowiscydozą, wspólnymi siłami podjęło działania mające na celu dopasowanie danych klinicznych ponad 39 000 pacjentów z mukowiscydozą do blisko 1900 wariantów genu mukowiscydozy zarejestrowanych przez lata w bazie danych CFTR1 w szpitalu dziecięcym w Toronto<sup>11,13</sup>. Oprócz danych genotypu CFTR analizowano również charakterystykę kliniczną, w tym m.in. stężenie chlorków w pocie, wydolność płuc (przewidywaną wartość wskaźnika nasilonej pierwszosekundowej objętości wydechowej [FEV1%]) czy stan trzustki. Uporządkowane podejście, polegające na jednoczesnym analizowaniu tych wariantów z perspektywy klinicznej, czynnościowej i genetycznej, poskutkowało ustaleniem 134 niepowtarzalnych wariantów powodujących mukowiscydozę w 129 niepowtarzalnych pozycjach w genomie (ponieważ w przypadku pięciu pozycji w jednej z nich występują dwie zmiany nukleotydu), jakie były opisane w bazie danych CFTR2 (stan na sierpień 2013 r.). Spodziewane jest, że zastosowanie panelu obejmującego wszystkie te warianty pozwoli ująć 95,4% alleli powodujących mukowiscydozę, a także zwiększy szansę rozpoznania par związanych z ryzykiem poprzez wykrycie obydwu alleli na poziomie ok. 91% z 72% uzyskiwanych przy zastosowaniu panelu zalecanego przez ACMG, który obejmuje 23 warianty.

## Warianty CFTR w panelu

Warianty raportowane przez test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy wybrano celowo, ponieważ stanowią one pełny zestaw klinicznie potwierdzonych wariantów zaklasyfikowanych jako powodujące mukowiscydozę w bazie danych CFTR2 prowadzonej przez Uniwersytet Johns Hopkinsa, która powstała w ramach inicjatywy CFTR2 na rzecz Klinicznej i Czynnościowej Translacji Genu CFTR (ang. Clinical and Functional Translation of CFTR).

Test wykrywa: 134 warianty powodujące mukowiscydozę, jeden wariant z panelu zalecanego przez ACMG (R117H, zaklasyfikowany w bazie danych CFTR2 jako mutacja o zmiennym następstwie klinicznym [ang. Mutation of Varying Clinical Consequence, MVCC]), jeden warunkowo raportowany wariant modyfikujący (PolyTG/PolyT) oraz trzy warunkowo raportowane warianty łagodne (I506V, I507V, F508C)<sup>14</sup>, co łącznie daje 139 raportowanych wariantów.

Uwzględnione w teście 134 warianty wywołujące mukowiscydozę odpowiadają 129 wariantom odpowiedzialnym za mukowiscydozę w bazie danych CFTR2. Baza danych CFTR2 obejmuje pięć wariantów powodujących mukowiscydozę, w przypadku których może wystąpić ta sama zmiana poziomu białka wywołana przez dwie oddzielne zmiany nukleotydu (np. S466X(C>A) i S466X(C>G)). Wyżej wymienionych pięć wariantów figuruje w bazie danych CFTR2 w oparciu o kodon aminokwasowy (np. S466X), natomiast test umożliwia raportowanie każdego z pojedynczych wariantów (np. S466X(C>A) i S466X(C>G)). Listę 139 wariantów raportowanych przez test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy zawiera **Tabela 2**. Pogrubiona czcionka = ACMG-23; kursywa = rozpoznawane warunkowo.

Tabela 2 Podsumowanie wariantów rozpoznawanych przez test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

[warianty są wymienione w kolejności opartej na współrzędnych genomowych, a zmianę poziomu nukleotydu powiązaną z danym wariantem podano w nawiasach].

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>	1213delIT (c.1081delIT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delITT (c.262_263delITT)	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)	2143delIT (c.2012delIT)	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_741delAGGGAGAAT) GATGATGAAGTAC)	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> Sklasyfikowany w bazie danych CFTR2<sup>12</sup> jako wariant powodujący mukowiscydozę, natomiast Sosnay w swojej pracy<sup>13</sup> klasyfikuje wpływ tego wariantu jako nieokreślony. Klasyfikacja podana w bazie danych jest bardziej aktualna i odzwierciedla wyniki zakończonych badań czynnościowych niedostępnych w momencie publikacji pracy Sosnaya.

## Podsumowanie i wyjaśnienia dotyczące testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

### Zasada działania testu

W przypadku wszystkich eksonów oprócz trzech (eksonu 7, 10 i 20) są wykrywane wszystkie regiony kodujące białka w genie CFTR łącznie z otaczającymi je sekwencjami intronowymi o długości 10 nt. W przypadku eksonów 7 i 10 do testu włączono jedynie otaczające sekwencje intronowe o długości 5 nt przy końcu 5' eksonu, aby uniknąć proksymalnych polimorfizmów typu indel w regionach homopolimerycznych. W przypadku eksonu 20 do testu włączono otaczającą sekwencję intronową o długości 30 nt przy końcu 5' eksonu, aby umożliwić wykrycie mutacji 3272-26A>G. Ponadto test wykrywa ok. 100 nt sekwencji otaczających przy końcu 5' i 3' regionów UTR, dwie głębokie mutacje intronowe (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T), dwie duże delecje (CFTRdele2,3; CFTRdele22,23) i region PolyTG/PolyT. Pełne pokrycie testu pokazują pozycje współrzędnych genomowych, patrz [Tabela 3](#).



**UWAGA:**

Istnieją pewne ograniczenia wykrywania delecji w określonych lokalizacjach genomowych w obrębie regionów sekwencjonowanych za pomocą tego testu (patrz *Ograniczenia procedury w teście Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy na stronie 9*).

Tabela 3 Pokrycie współrzędnych genomowych testu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

	Początek współrzędnej genomowej hg19 (chr7)	Koniec współrzędnej genomowej hg19 (chr7)	Długość (liczba par nukleotydów)
Ekson_CFTR 1	117120041	117120211	171
Ekson_CFTR 2	117144297	117144427	131
Ekson_CFTR 3	117149078	117149206	129
Ekson_CFTR 4	117170943	117171178	236
Ekson_CFTR 5	117174320	117174429	110
Ekson_CFTR 6	117175292	117175475	184
Ekson_CFTR 7 <sup>^</sup>	117176597	117176737	141
Ekson_CFTR 8	117180144	117180410	267
Ekson_CFTR 9	117182060	117182172	113
Ekson_CFTR 10 <sup>^</sup>	117188690	117188887	198
Ekson_CFTR 11	117199508	117199719	212
Ekson_CFTR 12	117227783	117227897	115
Intron_CFTR 12 <sup>*</sup>	117229516	117229526	11
Ekson_CFTR 13	117230397	117230503	107
Ekson_CFTR 14	117231978	117232721	744
Ekson_CFTR 15	117234974	117235122	149
Ekson_CFTR 16	117242870	117242927	58
Ekson_CFTR 17	117243576	117243846	271
Ekson_CFTR 18	117246718	117246817	100
Ekson_CFTR 19	117250563	117250733	171
Ekson_CFTR 20 <sup>#</sup>	117251605	117251872	268
Ekson_CFTR 21	117254657	117254777	121
Ekson_CFTR 22	117267566	117267834	269
Intron_CFTR 22 <sup>*</sup>	117280010	117280020	11
Ekson_CFTR 23	117282482	117282657	176
Ekson_CFTR 24	117292886	117292995	110
Ekson_CFTR 25	117304732	117304924	193
Ekson_CFTR 26	117305503	117305628	126
Ekson_CFTR 27	117306952	117307262	311
Łączna liczba nukleotydów			5203 <sup>**</sup>

<sup>^</sup> W przypadku eksonów 7 i 10 do testu włączono jedynie otaczające sekwencje intronowe o długości 5 nt przed eksonem, aby uniknąć w tych regionach odcinków homopolimerycznych. W przypadku eksonu 10 jest to region PolyT/PolyTG w intronie 9. Region ten jest odrębnie traktowany w specjalny sposób.

<sup>\*</sup> W przypadku głębokich mutacji intronowych uwzględniono również 5 nukleotydów otaczających SNV po obu stronach.

<sup>#</sup> W przypadku eksonu 20 do testu włączono otaczającą sekwencję intronową o długości 30 nt przy końcu 5' eksonu, aby umożliwić wykrycie mutacji 3272-26A>G.

<sup>\*\*</sup> Przy dwóch dużych delecjach i występowaniu regionów PolyTG/PolyT całkowita liczba pozycji/regionów wynosi 5206.

## Zasady dotyczące procedury

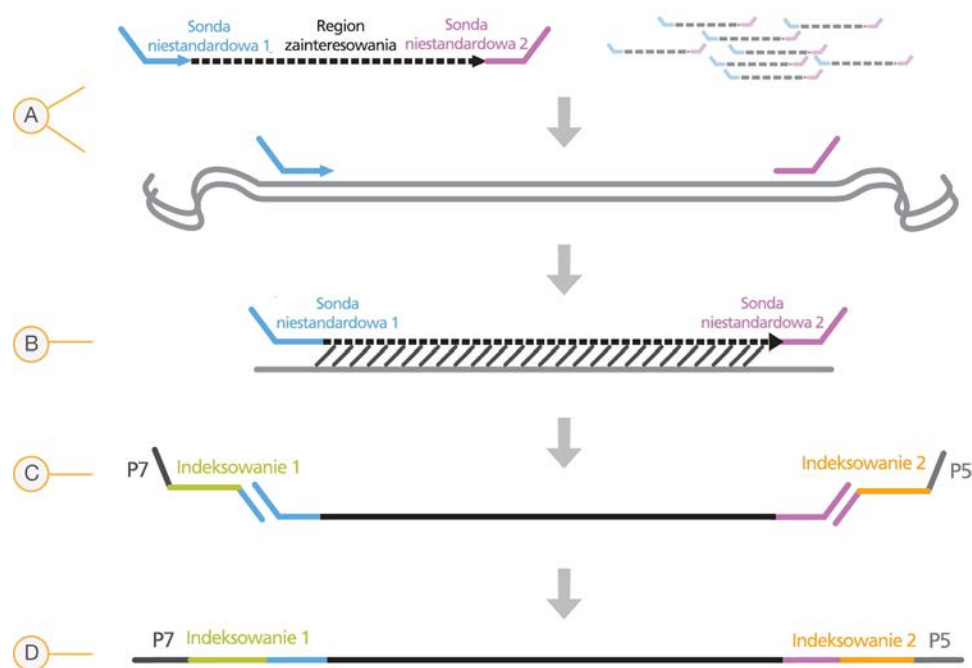
Zestaw do przygotowywania bibliotek TruSight Cystic Fibrosis Library Prep jest przeznaczony do ręcznego przygotowywania bibliotek służących do sekwencjonowania DNA z próbek obwodowej krwi pełnej. Procedura przygotowania bibliotek składa się z następujących etapów: hybrydyzacja, wydłużanie i ligacja, amplifikacja metodą PCR oraz normalizacja biblioteki.



### UWAGA

Procedury przygotowywania bibliotek do testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy są identyczne.

## Przygotowanie bibliotek



- A **Hybrydyzacja** - pierwszy etap, czyli hybrydyzacja, polega na hybrydyzacji puli wcześniejszych i dalszych oligonukleotydów swoistych dla genu mukowiscydozy do wejściowego DNA genomowego. Na końcu tego procesu trzyetapowa procedura płukania za pomocą filtra z możliwością wyboru rozmiaru powoduje usunięcie niezwiązanych oligonukleotydów z genomowego DNA.
- B **Reakcja wydłużania i ligacji** - drugi etap, czyli reakcja wydłużania i ligacji, powoduje połączenie hybrydowanych oligonukleotydów wcześniejszych i dalszych. Obszar działania polimerazy DNA zaczyna się w oligonukleotydach wcześniejszych i rozciąga na region docelowy, po czym następuje ligacja do końca 5' oligonukleotydu dalszego przy użyciu ligazy DNA. Skutkiem jest powstanie produktów zawierających oligonukleotydy swoiste dla mukowiscydozy otoczone sekwencjami wymaganymi do amplifikacji.
- C **Amplifikacja metodą PCR** - trzeci etap, czyli amplifikacja metodą PCR, powoduje amplifikację produktów wydłużania i ligacji przy użyciu adapterów indeksu, które dodają sekwencje indeksu przeznaczone do multipleksowania próbki, a także adaptery wymagane do generacji klastra w aparacie MiSeqDx. Na końcu tego procesu procedura czyszczenia PCR powoduje oczyszczenie produktów amplifikacji PCR (określanych jak biblioteka).

- D **Normalizacja biblioteki** - ostatni etap, czyli normalizacja biblioteki, polega na normalizacji wielkości każdej z bibliotek, aby zapewnić zrównoważoną reprezentację bibliotek w ostatecznej spulowanej bibliotece. Na końcu tego procesu spulowana biblioteka jest przesyłana do aparatu MiSeqDx w celu zastosowania technologii sekwencjonowania przez syntezę (ang. sequencing by synthesis, SBS).

## Sekwencjonowanie

W technologii SBS stosowana jest metoda terminatora odwracalnego, służąca do wykrywania nukleotydów w miarę ich wiązania w rosnących łańcuchach DNA. Podczas każdego cyklu sekwencjonowania do łańcucha kwasów nukleinowych jest dodawany pojedynczy, znakowany fluorescencyjnie trifosforan deoksyrybonukleotydu (ang. deoxynucleotide triphosphate, dNTP). Oznakowanie nukleotydów służy jako terminator polimeryzacji. Tak więc po każdym wprowadzeniu dNTP fluorescencyjny barwnik jest obrazowany w celu identyfikacji nukleotydu, a następnie enzymatycznie rozdzielany, aby umożliwić wprowadzenie kolejnego nukleotydu. Ponieważ wszystkie cztery dNTP (A, G, T, C) związane z terminatorem odwracalnym są obecne jako pojedyncze, osobne cząsteczki, naturalna konkurencja minimalizuje błąd systematyczny wynikający z wprowadzania nukleotydów. Rozpoznawanie nukleotydów odbywa się bezpośrednio na podstawie pomiarów natężenia sygnału podczas kolejnych cykli sekwencjonowania. Skutkiem tego jest sekwencjonowanie nukleotyd po nukleotydzie.

## Analiza danych

Pierwszy etap w analizie danych określa się jako analizę podstawową. Proces ten jest przeprowadzany za pomocą oprogramowania Real Time Analysis (RTA) do analizy w czasie rzeczywistym i umożliwia on rozpoznawanie nukleotydów i ocenianie jakości. W kolejnym etapie, nazywanym analizą wtórną, rozpoznania nukleotydów wygenerowane podczas analizy podstawowej są przetwarzane w celu zgromadzenia informacji o każdej próbce. Analiza wtórna, przeprowadzana za pomocą oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu, obejmuje demultipleksowanie, tworzenie plików FASTQ, dopasowywanie, rozpoznawanie wariantów oraz tworzenie plików VCF zawierających informacje o wariantach wykrytych na określonych pozycjach w genomie referencyjnym.

- ▶ **Demultipleksowanie** - jeśli przebieg obejmuje wiele próbek i ma odczyty indeksów, jest to pierwszy krok w analizie wtórnej. Demultipleksowanie powoduje oddzielenie danych od spulowanych próbek w oparciu o niepowtarzalne indeksy sekwencji dodane podczas etapu amplifikacji metodą PCR.
- ▶ **Tworzenie plików FASTQ** - po demultipleksowaniu oprogramowanie lokalnego menedżera przebiegu generuje pliki pośrednie w formacie FASTQ, który jest formatem tekstowym używanym do przedstawiania sekwencji. Pliki FASTQ zawierają odczyty poszczególnych próbek oraz oceny jakościowe z wyłączeniem odczytów z klastrów, które nie przeszły przez filtr.
- ▶ **Dopasowywanie** - dopasowywanie polega na porównaniu sekwencji ze wzorcem w celu określenia relacji pomiędzy sekwencjami oraz przypisaniu wyniku jakościowego na podstawie regionów wykazujących podobieństwo. Dopasowane odczyty są zapisywane do plików w formacie BAM. W przypadku testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy oraz testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy za pomocą pasmowego algorytmu Smitha-Watermana przeprowadzana są miejscowe dopasowania sekwencji, aby ustalić, które regiony w dwóch sekwencjach są podobne.
- ▶ **Rozpoznawanie wariantów** - w tym etapie następuje zapis informacji o wariantach pojedynczego nukleotydu (SNV), insercjach i delecjach (polimorfizmach typu indel) oraz innych wariantach strukturalnych w standardowym pliku tekstowym o nazwie TruSightCF139VariantAssay.txt w przypadku testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy lub TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt w przypadku testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy.

Więcej informacji na temat procedury analizy można znaleźć w instrukcjach dotyczących oprogramowania analitycznego zainstalowanego w aparacie MiSeqDx. *Instrukcja wykonywania procedur analitycznych przy użyciu modułu lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, ver. 2.0, patrz (nr dokumentu: 1000000100945). Instrukcja wykonywania procedur analitycznych przy użyciu modułu lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, ver. 2.0, patrz (nr dokumentu: 1000000100946). Instrukcję wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu*



do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, ver. 2.0 Micro, zawiera (nr dokumentu: 200017946). Instrukcję wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, ver. 2.0 Micro, zawiera (nr dokumentu: 200017945).

## Ograniczenia procedury w teście Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

- ▶ Do celów diagnostyki *in vitro*.
- ▶ Wyniki uzyskane za pomocą testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy należy stosować i interpretować w kontekście pełnej oceny klinicznej.
- ▶ Test jest przeznaczony do identyfikacji określonych podzbiorów znanych wariantów w genie CFTR, ale nie obejmuje wszystkich wariantów zidentyfikowanych w genie CFTR. Cechą swoistą testu jest raportowanie zmian na poziomie aminokwasów wyłącznie wtedy, gdy są powiązane ze zmianami nukleotydów, patrz [Tabela 2](#). Inne zmiany na poziomie nukleotydów mogą prowadzić do takich samych zmian na poziomie aminokwasów, ale nie są one raportowane przez ten test. Dlatego brak identyfikacji danego wariantu nie gwarantuje, że w analizowanych próbkach nie ma innych wariantów CFTR.
- ▶ Częstotliwość występowania zidentyfikowanych przez niniejszy test wariantów jest różna w różnych populacjach.
- ▶ Tak jak w przypadku każdego testu opartego na hybrydyzacji odpowiednie polimorfizmy lub warianty w regionach wiązań oligonukleotydów mogą mieć wpływ na badane allele, a związku z tym na rozpoznania nukleotydów.
- ▶ Test nie pozwala na ustalenie, czy orientacja wariantu PolyTG/PolyT jest orientacją cis, czy też trans względem wariantu R117H. W przypadku pacjentów z wariantem R117H należy przeprowadzić dodatkowe testy w celu ustalenia, czy wariant PolyTG/PolyT, który może wpływać na fenotyp kliniczny (np. 12-13(TG) lub 5T) jest w orientacji cis czy trans w stosunku do wariantu R117H.
- ▶ Warianty PolyTG/PolyT są regionami homopolimerycznymi, których interpretacja za pomocą testów opartych na sekwencjonowaniu jest trudna ze względu na możliwość wystąpienia poślizgu polimerazy. Dla wyników PolyTG/PolyT zaobserwowano współczynnik nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów na poziomie 0,9% (4/448), co wskazuje na odchylenie  $\pm 1$  TG w porównaniu z sekwencjonowaniem dwukierunkowym metodą Sangera, patrz [Tabela 16](#).

## Ograniczenia procedury w teście Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

- ▶ Do celów diagnostyki *in vitro*.
- ▶ Wyniki uzyskane za pomocą testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy należy stosować i interpretować w kontekście pełnej oceny klinicznej.
- ▶ Test sekwencjonuje następujące regiony w obrębie genu CFTR:
  - ▶ Wszystkie regiony kodowania białek w genie CFTR w 27 eksonach.
  - ▶ Od 5 do 10 nukleotydów otaczającej sekwencji intronowej.
  - ▶ 100 nukleotydów sekwencji intronowej w regionach 5' i 3' niepodlegających translacji.
  - ▶ Dwie głębokie mutacje intronowe (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T).
  - ▶ Sekwencję PolyTG/PolyT zlokalizowaną w intronie 9.
  - ▶ Łącznie 5206 pozycji/regionów z możliwych 188 702 par nukleotydów w genie.
- ▶ Test jest przeznaczony do sekwencjonowania regionów kodowania białek oraz połączeń intron-ekson genu CFTR. Nie obejmuje wszystkich regionów intronowych ani dużych delecji. Dlatego ogólny wynik wskazujący na typ dziki nie gwarantuje, że inne mutacje/warianty błonowego regulatora przewodnictwa związanego z mukowiscydozą (CFTR) nie są obecne w analizowanych próbkach.
  - ▶ Test jest przeznaczony do wykrywania dwóch swoistych dużych delecji: CFTRdele2,3 i CFTRdele22,23. Test nie jest w stanie wykryć ani zaraportować innych dużych delecji. Test ma walidację tylko dla insercji i delecji do rozmiaru 3 bp włącznie.

- ▶ Wszystkie insercje/delekcje są dopasowywane w lewo w regionach homopolimerycznych w przeciwieństwie do dopasowania w prawo zgodnie z nomenklaturą HGVS. Na przykład wariant c.313delA (z kontekstem sekwencji GAATC) jest identyfikowany jako delekcja G-ATC, ale delekcja jest raportowana w bazie dbSNP jako delekcja GA-TC. Wyjątkiem od tego jest 135 wariantów genu mukowiscydozy wymienionych w CFTR2 jako powodujące chorobę (na podstawie bazy danych o wariantach z dnia 04.10.2012 r.). Wszystkie polimorfizmy typu indel w regionach homopolimerycznych w obrębie tego zbioru wariantów są raportowane w celu dopasowania raportowania oczekiwanych wariantów zgodnie z CFTR2<sup>13</sup>.
- ▶ Test ma ograniczenie wykrywania delekcji w określonych lokalizacjach genetycznych w obrębie sekwencjonowanych regionów. Współrzędne genomowe, w przypadku których test nie może raportować delekcji, zawiera [Tabela 4](#). Test nie jest w stanie wykryć delekcji obejmujących nukleotyd lub nukleotydy z kolumny ograniczeń.

Tabela 4 Współrzędne genomowe, w przypadku których delekcje nie mogą zostać wykryte

Region genu CFTR	Współrzędne genomowe hg19 (chr7)
CFTR_Ekson 1	117120041; 117120211
CFTR_Ekson 3	117149091
CFTR_Ekson 4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Ekson 5	117174362
CFTR_Ekson 6	117175417
CFTR_Ekson 7	117176621
CFTR_Ekson 8	117180176-117180177*
CFTR_Ekson 9	117182126
CFTR_Ekson 10	117188771
CFTR_Ekson 11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Ekson 12	117227802
CFTR_Ekson 14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Ekson 17	117243705; 117243843
CFTR_Ekson 18	117246751
CFTR_Ekson 19	117250688
CFTR_Ekson 20	117251788
CFTR_Ekson 22	117267721
CFTR_Ekson 23	117282597
CFTR_Ekson 24	117292953
CFTR_Ekson 25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Ekson 26	117305518
CFTR_Ekson 27	117307178

\* Nie można wykryć tylko delekcji obejmujących obydwa wymienione nukleotydy. Na przykład w eksonie 8 nie można wykryć tylko delekcji o wielkości  $\geq 2$  bp obejmujących nukleotydy na obydwu współrzędnych genomowych 117180176 i 117180177. Można wykryć pojedynczą delekcję na współrzędnych 117180176 lub 117180177.

- ▶ Jeśli dana współrzędna (patrz [Tabela 4](#)) jest nukleotydem najbardziej wysuniętym na lewo w obrębie regionu homopolimerycznego, nie ma możliwości wykrycia delekcji w jakiegokolwiek innej pozycji w obrębie odcinka homopolimerycznego, ponieważ nie można jej odróżnić od delekcji na tej współrzędnej.
- ▶ Test nie jest w stanie wykryć łącznie pięciu wariantów wymienionych w bazie danych klinicznych ClinVar (dostęp do bazy danych w wersji z grudnia 2014 r.). Te pięć wariantów zawiera [Tabela 5](#). Ograniczenie testu nie wpływa na żaden wariant wymieniony w bazie danych dotyczącej mukowiscydozy, CFTR2 (wersja bazy danych z dnia 04.10.2012 r.). Dane dotyczące częstotliwości nie były dostępne dla żadnego z wariantów.

Tabela 5 Znane warianty niewykrywane przez test Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Nr wariantu	Identyfikator ClinVar	Region genu CFTR	Lokalizacja genomowa (chr 7)	Nazwa cDNA [HGVS]	Nazwa białka (HGVS)	Identyfikator rs
1	RCV000046424	CFTR_Ekson 3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269
2	RCV000046687	CFTR_Ekson 17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_Ekson 17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_Ekson 19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_Ekson 20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

\* W tych przypadkach współrzędne znajdują się w obrębie danego regionu homopolimerycznego.

- ▶ Częstotliwość występowania identyfikowanych przez niniejszy test wariantów jest różna w różnych populacjach. Nie jest możliwa walidacja wszystkich kombinacji wariantów, które mogłyby zostać wykryte w genie CFTR przez ten test. Zalecane jest potwierdzanie przez użytkownika nowych i rzadkich wariantów za pomocą zatwierdzonej metody referencyjnej.
- ▶ Podobnie jak w przypadku innych testów opartych na hybrydyzacji, odpowiednie polimorfizmy, mutacje, insercje lub delecje w regionach wiązań oligonukleotydów mogą mieć wpływ na badane allele, a w związku z tym na rozpoznania nukleotydów.
- ▶ W przypadku złożonych wariantów, w których delecja i insercja występują jednocześnie, test może raportować to jako dwa osobne warianty w bliskiej odległości. Fazowanie wariantów nie jest oceniane i należy rozważyć inne możliwe rozwiązania w odniesieniu do wykrytej sekwencji. Przykład złożonego wariantu o takim charakterze zawiera [Tabela 6](#).

Tabela 6 Złożony wariant, przykład

Kontekst sekwencjonowania (odniesienie)	GAAGAAATT
Sekwencja obserwowana dla wariantu	GAAT -- ATT
Oczekiwany wariant	Delecja GAA, insercja T (obie zmiany na tym samym chromosomie)
Warianty zaraportowane przez test	SNP (G>T); delecja AA

- ▶ Jeśli w próbce zostaną zweryfikowane więcej niż dwa warianty, zaleca się, aby użytkownik zweryfikował wynik poprzez ponowną analizę próbki za pomocą aparatu MiSeqDx i świeżego ekstraktu gDNA w celu wykluczenia zanieczyszczenia krzyżowego próbki.



#### UWAGA

Gdy liczba wykrytych wariantów wyniesie 2 lub więcej, należy rozważyć zastosowanie fazowania haplotypu. Test nie pozwala na ustalenie, czy warianty są względem siebie w orientacji cis czy trans.

- ▶ Test nie pozwala na ustalenie, czy orientacja wariantu PolyTG/PolyT jest orientacją cis, czy też trans względem innych wariantów. U pacjentów z wariantem R117H należy wykonać dodatkowe badanie w celu stwierdzenia, czy wariant PolyTG/PolyT, mogący wpływać na fenotyp kliniczny (np. 12-13(TG) lub 5T) znajduje się w orientacji cis, czy też trans.

Warianty PolyTG/PolyT są regionami homopolimerycznymi, których sekwencjonowanie jest trudne ze względu na możliwość wystąpienia poślizgu polimerazy.

## Elementy produktu

Zestaw TruSight Cystic Fibrosis Kit do oznaczaniu genu mukowiscydozy składa się z następujących elementów:

- ▶ Zestaw do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (nr kat.: 20036925)

## Dostarczane odczynniki

Odczynniki do zestawu do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep zapewnia firma Illumina. Zestaw został skonfigurowany do 1-4 zastosowań przy maksymalnej liczbie 96 próbek na zestaw.

### Zestaw do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, opakowanie 1

Odczynniki w opakowaniu 1 są dostarczane jako zamrożone i zachowują stabilność w temp. od -25°C do -15°C. Odczynniki pozostają stabilne przez maksymalnie 6 cykli zamrażania i rozmrażania do upływu określonej daty ważności.

Tabela 7 Odczynniki przed amplifikacją, opakowanie 1A

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Puła oligonukleotydów do mukowiscydozy	1 probówka	600 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający oligonukleotydy nakierowane na gen <i>CFTR</i> .	Od -25°C do -15°C
Bufor do hybrydyzacji	1 probówka	4,32 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i formamid.	Od -25°C do -15°C
Mieszanina do reakcji wydłużania i ligacji	1 probówka	4,8 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający opatentowaną mieszanę polimeraz DNA, ligazy DNA i dNTP.	Od -25°C do -15°C
Startery do indeksowania 2 (A501-A508)	1 probówka na starter	192 µl	Startery PCR z sekwencjami do indeksowania i adapterami sekwencjonowania.	Od -25°C do -15°C
Startery do indeksowania 1 (A701-A712)	1 probówka na starter	128 µl	Startery PCR z sekwencjami do indeksowania i adapterami sekwencjonowania.	Od -25°C do -15°C
Polimeraza PCR	1 probówka	56 µl	Opatentowana polimeraza DNA.	Od -25°C do -15°C
Mieszanina wyjściowa do reakcji PCR	1 probówka	2,8 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i dNTP.	Od -25°C do -15°C

Tabela 8 Odczynniki po amplifikacji, opakowanie 1B

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Rozcieńczalnik do normalizacji biblioteki	1 probówka	4,6 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, 2-merkaptoetanol i formamid.	Od -25°C do -15°C
Bufor do rozcieńczeń biblioteki	1 probówka	4,5 ml	Buforowany roztwór wodny.	Od -25°C do -15°C
Kontrola wewnętrzna PhiX	1 probówka	10 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający genomowe DNA PhiX.	Od -25°C do -15°C

### Zestaw do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, opakowanie 2

Odczynniki z opakowania 2 są dostarczane w temperaturze pokojowej i pozostają stabilne w temp. 15-30°C do upływu określonej daty ważności.

Tabela 9 Odczynniki przed amplifikacją, opakowanie 2

Element	Ilość	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne	Przechowywanie
Płytki z filtrem	4 płytki	nd.	Polipropylenowa płytka do mikromiarczkowania ze zmodyfikowaną membraną z polieterosulfonu.	Od 15°C do 30°C

Tabela 10 Odczynniki po amplifikacji, opakowanie 2

Element	Ilość	Objętość wypełnienia (ml)	Składniki aktywne	Przechowywanie
Bufor do elucji	1 probówka	4,8	Buforowany roztwór wodny	Od 15°C do 30°C
Bufor do przechowywania biblioteki	1 probówka	3,5	Buforowany roztwór wodny	Od 15°C do 30°C

### Zestaw do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, opakowanie 3

Odczynniki z opakowania 3 są dostarczane jako schłodzone i pozostają stabilne w temp. 2-8°C do upływu określonej daty ważności.

Tabela 11 Odczynniki przed amplifikacją, opakowanie 3A

Element	Ilość	Objętość wypełnienia (ml)	Składniki aktywne	Przechowywanie
Bufor intensywnie płuczący	1 butelka	24	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, 2-merkaptioetanol i formamid.	Od 2°C do 8°C
Uniwersalny bufor płuczący	1 probówka	4,8	Buforowany roztwór wodny zawierający sole.	Od 2°C do 8°C

Tabela 12 Odczynniki po amplifikacji, opakowanie 3B

Element	Ilość	Objętość wypełnienia (ml)	Składniki aktywne	Przechowywanie
Nośniki do czyszczenia PCR	1 probówka	5	Buforowany roztwór wodny zawierający kulki paramagnetyczne w fazie stałej oraz glikol polietylenowy.	Od 2°C do 8°C
Bufor płuczący do normalizacji biblioteki	2 probówki	4,8	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, 2-merkaptioetanol i formamid.	Od 2°C do 8°C
Nośniki biblioteki	1 probówka	1,2	Buforowany roztwór wodny zawierający kulki paramagnetyczne w fazie stałej.	Od 2°C do 8°C

## Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

### Odczynniki przed amplifikacją

- ▶ 10 N NaOH (przygotować z tabletek lub zastosować standardowy roztwór)
- ▶ Bufor TE
- ▶ Woda pozbawiona RNazy/DNazy

## Odczynniki po amplifikacji

- ▶ 10 N NaOH (przygotować z tabletek lub zastosować standardowy roztwór)
- ▶ Etanol (EtOH) absolutny, do zastosowań w biologii molekularnej
- ▶ Bufor TE
- ▶ Woda pozbawiona RNazy/DNazy

## Odczynniki MiSeqDx

- ▶ Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 (nr kat.: 20012552 lub 20037124, w zależności od regionu) lub zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (nr kat.: 20063860)
- ▶ Podchloryn sodu o stężeniu 5%
- ▶ Tween 20
- ▶ Woda o jakości laboratoryjnej

## Przechowywanie i sposób postępowania

- 1 Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- 2 Bufor hybrydyzacyjny, bufor intensywnie płuczący i odczynniki rozcieńczające do normalizacji bibliotek mogą tworzyć widoczny osad lub kryształki. Przed użyciem wymieszać intensywnie przez worteksowanie, a następnie obejrzeć, aby upewnić się, że nie ma osadu.
- 3 Z nośnikami do czyszczenia PCR i nośnikami biblioteki należy postępować według następujących zasad:
  - ▶ Nośników nie wolno zamrażać.
  - ▶ Nośniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
  - ▶ Bezpośrednio przed użyciem należy poddać nośniki worteksowaniu do momentu, aż zawiesina stanie się jednorodna i jej kolor będzie jednolity.
  - ▶ Po dodaniu nośników dokładnie zmieszać próbkę przez 10-krotne pipetowanie w górę i w dół. Do dokładnego zmieszania próbek można użyć wstrząsacza.
  - ▶ Należy inkubować mieszaninę nośników z próbką w temperaturze pokojowej przez cały wskazany czas.
  - ▶ Z magnetycznej podstawki należy korzystać zgodnie z instrukcją. Przed aspiracją należy odczekać, aż roztwór będzie przejrzysty. Pozostawić płytkę na podstawie magnetycznej, wolno aspirując nadsącz i uważając, aby nie poruszyć odseparowanych nośników.
- 4 Nie zamrażać nośników biblioteki ani nie mieszać ich z odczynnikiem rozcieńczającym do normalizacji bibliotek, jeśli nie zostaną wykorzystane od razu.

## Sprzęt i materiały

### Dostarczone wyposażenie i materiały, sprzedawane osobno

- ▶ Aparat MiSeqDx, nr kat.: DX-410-1001
- ▶ Zestaw uchwytów płytki TruSeq Index Plate Fixture Kit umożliwiającej prawidłowy dobór indeksów, nr kat.: FC-130-1005
- ▶ Zestaw uchwytów i kołnierzy płytki TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit umożliwiającej prawidłowy dobór indeksów, nr kat.: FC-130-1007
- ▶ Zamienne nasadki adaptera indeksu Index Adapter Replacement Cap, nr kat.: DX-502-1003
- ▶ Probówka MiSeq, nr kat.: MS-102-9999

## Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

### Sprzęt i materiały do zastosowania przed amplifikacją

- ▶ **Blok grzejny** - potrzebny jest jeden blok grzejny do płytki 96-dołkowej. Do użytku dopuszczone są bloki grzejne z podgrzewanym wiekiem. Zastosowanie termocyklerów lub bloków grzejnych z aktywnym chłodzeniem (np. Peltier, z chłodzeniem termoelektrycznym) nie jest zalecane do etapu hybrydyzacji. Etap chłodzenia biernego ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej hybrydyzacji. Blok grzejny musi mieć następujące parametry:
  - ▶ zakres temperatury: temp. otoczenia +5°C do 99°C,
  - ▶ regulacja temperatury:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  przy 37°C;  $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$  przy 60°C.
- ▶ **Inkubator próbek** - potrzebny jest jeden inkubator (piec do hybrydyzacji). Inkubator musi mieć następujące parametry:
  - ▶ zakres temperatury: od 10°C do 100°C,
  - ▶ regulacja temperatury:  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .
- ▶ **Wirówka stołowa** - potrzebna jest wirówka stołowa z kontrolą temperatury i możliwością jej utrzymania na poziomie 20°C. W obszarze przeznaczonym do czynności po amplifikacji wymagana jest osobna wirówka. Dopuszczalna jest dowolna wirówka płytek, która pasuje do 96-dołkowej płytki z filtrem i osiąga prędkości wyznaczone w protokole (od 280 do 2400 × g).
- ▶ **Pipety precyzyjne** - potrzebny jest jeden zestaw pipet precyzyjnych. W obszarze przeznaczonym do czynności po amplifikacji wymagany jest osobny zestaw. Zastosowanie pipet precyzyjnych jest konieczne do zapewnienia dokładnego podawania odczynników i próbek. Można stosować pipety jedno- lub wielokanałowe, pod warunkiem że są regularnie kalibrowane i zapewniają dokładność w zakresie 5% wskazanej objętości.
- ▶ **Materiały eksploatacyjne** - potrzebne są następujące materiały eksploatacyjne:
  - ▶ 96-dołkowe płytki PCR z kołnierzem; 0,2 ml; polipropylenowe (lub odpowiednik);
  - ▶ 96-dołkowe płytki do przechowywania; 0,8 ml (płytki MIDI);
  - ▶ zbiornik do roztworów, PCW, bez DNazy i RNazy (korytko);
  - ▶ samoprzylepna uszczelka z folii aluminiowej;
  - ▶ odpowiednie zamknięcie płytki PCR;
  - ▶ końcówki pipet odporne na aerozole;
  - ▶ probówki stożkowe, 15 ml.

### Sprzęt i materiały do zastosowania po amplifikacji

- ▶ **Termocykler** - potrzebny jest jeden termocykler. Termocykler musi mieć podgrzewane wieko i następujące parametry:
  - ▶ zakres kontroli temperatury: od 4°C do 99°C,
  - ▶ dokładność temperatury:  $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$  od 35°C do 99°C.
- ▶ **Wstrząsacz mikroplatek** - w obszarze laboratoryjnym do czynności po amplifikacji potrzebny jest jeden wstrząsacz mikroplatek. Wstrząsacz płytek musi mieć następujące parametry:
  - ▶ maksymalna prędkość mieszania: 3000 obr./min,
  - ▶ zakres prędkości mieszania: od 200 do 3000 obr./min.
- ▶ **Wirówka stołowa** - potrzebna jest jedna wirówka stołowa z możliwością utrzymania temperatury 20°C. W obszarze przeznaczonym do czynności przed amplifikacją wymagana jest osobna wirówka. Dopuszczalna jest dowolna wirówka płytek, która osiąga prędkości wyznaczone w protokole (od 280 do 2400 × g).
- ▶ **Blok grzejny** - potrzebny jest jeden blok grzejny do probówek. Blok grzejny musi mieć następujące parametry:
  - ▶ zakres temperatury: temp. otoczenia +5°C do 99°C,
  - ▶ regulacja temperatury:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  przy 37°C;  $\pm 0,4^{\circ}\text{C}$  przy 60°C.
- ▶ **Podstawa magnetyczna** - wymagana jest jedna podstawa magnetyczna do 96-dołkowej płytki. Lepsze wyniki obserwowano, gdy magnesy znajdowały się z boku podstawki zamiast na jej spodzie.

- ▶ **Pipety precyzyjne** - potrzebny jest jeden zestaw pipet precyzyjnych. W obszarze przeznaczonym do czynności przed amplifikacją wymagany jest osobny zestaw. Zastosowanie pipet precyzyjnych jest konieczne do zapewnienia dokładnego podawania odczynników i próbek. Można stosować pipety jedno- lub wielokanałowe, pod warunkiem że są regularnie kalibrowane i zapewniają dokładność w zakresie 5% wskazanej objętości.
- ▶ **Wirówka stołowa** - potrzebna jest wirówka stołowa z kontrolą temperatury i możliwością utrzymania jej na poziomie 20°C, w której można stosować próbki do mikrowirówek. Dopuszczalna jest dowolna wirówka, która osiąga prędkości wyznaczone w protokole (od 280 do 1000 × g).
- ▶ **Materiały eksploatacyjne** - potrzebne są następujące materiały eksploatacyjne:
  - ▶ 96-dołkowe płytki PCR z kołnierzem; 0,2 ml; polipropylenowe (lub odpowiednik);
  - ▶ 96-dołkowe płytki do przechowywania; 0,8 ml (płytki MIDI);



#### UWAGA

Upewnić się, że 96-dołkowa płytka pasuje do podstawki magnetycznej.

- ▶ próbki stożkowe, 15 ml i 50 ml;
- ▶ próbki do mikrowirówek (zalecany model z gwintem);
- ▶ podstawki PCR z ośmioma probówkami;
- ▶ zbiorniki do roztworów, PCW, bez DNazy i RNazy (korytko);
- ▶ samoprzylepne zamknięcia z folii aluminiowej;
- ▶ samoprzylepne jednorazowe zamknięcia płytki;
- ▶ końcówki pipet odporne na aerozole.

## Pobieranie, transport i przechowywanie próbek



#### UWAGA

Wszelkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

- ▶ Można użyć próbek krwi pełnej pobranych do probówek z K<sub>2</sub>EDTA.
- ▶ Próbki krwi pełnej można przechowywać maksymalnie przez 7 dni w temperaturze pokojowej, 30 dni w temperaturze od 2°C do 8°C i 30 dni, jeśli zostaną zamrożone w temperaturze od -25°C do -15°C.
- ▶ Pełną krew można transportować maksymalnie przez 7 dni w temperaturze pokojowej, 30 dni w temperaturze od 2°C do 8°C i 30 dni, jeśli jest zamrożona w temperaturze od -25°C do -15°C. Transport pełnej krwi musi się odbywać zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi lub lokalnymi w zakresie transportu czynników etiologicznych.
- ▶ Po poddaniu genomowego DNA 6 cyklom zamrażania i rozmrażania nie zaobserwowano negatywnego wpływu na działanie testu.
- ▶ Nie zaobserwowano negatywnego wpływu na działanie testu w przypadku próbek krwi pełnej z podwyższonym poziomem bilirubiny, cholesterolu, trójglicerydów, EDTA oraz hemoglobiny.

## Ostrzeżenia i środki ostrożności



#### PRZESTROGA

Prawo federalne dopuszcza sprzedaż tego urządzenia do użytku lub zlecenia użytku wyłącznie przez lekarza lub na jego zlecenie, bądź innego specjalistę posiadającego ważną licencję stanu, w którym prowadzi praktykę.



**OSTRZEŻENIE**

**Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednio do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi.** Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). (Więcej informacji w punkcie *Dostarczane odczynniki na stronie 12*).

- ▶ Niektóre elementy tego testu zawierają 2-merkaptioetanol, który jest środkiem redukującym. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Odczynniki należy stosować w dobrze wentylowanych pomieszczeniach, a pojemniki i niezużyta zawartość należy utylizować zgodnie z rządowymi normami bezpieczeństwa w kraju użytkownika. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). (Więcej informacji w punkcie *Dostarczane odczynniki na stronie 12*).
- ▶ Niektóre elementy tego testu zawierają formamid - amid alifatyczny prawdopodobnie wykazujący toksyczność reprodukcyjną. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne, usuwając je zgodnie ze standardami bezpieczeństwa obowiązującymi w danym regionie. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html). (Więcej informacji w punkcie *Dostarczane odczynniki na stronie 12*).
- ▶ Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do firmy Illumina i właściwego organu państwa członkowskiego, w którym przebywa użytkownik i/lub pacjent.
- ▶ Wszelkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakaźne.
- ▶ Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości próbek.
- ▶ Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.
- ▶ Nie należy używać żadnego ze składników testu po upływie terminu ważności podanego na etykiecie umieszczonej na opakowaniu testu. Nie należy mieszać składników testów z różnych partii. Numer partii testu znajduje się na etykiecie umieszczonej na opakowaniu testu.
- ▶ Aby zapobiec degradacji próbki lub odczynnika, przed rozpoczęciem protokołu należy upewnić się, że pary podchlorynu sodu całkowicie się rozproszyły.
- ▶ Przestrzeganie zasad wykonywania prac laboratoryjnych oraz zachowanie higieny w laboratorium jest wymagane, aby produkty reakcji PCR nie zanieczyściły odczynników, przyrządów lub próbek genomowego DNA. Zanieczyszczenie PCR może powodować niedokładne i niepewne wyniki.
- ▶ Zmiany w fizycznym wyglądzie odczynników mogą wskazywać na pogorszenie się stanu materiałów. Jeśli wystąpią zmiany w wyglądzie fizycznym (np. oczywiste zmiany koloru odczynnika lub zmętnienie widoczne w wyniku skażenia mikrobiologicznego), odczynników nie należy używać.
- ▶ Aby zapobiegać zanieczyszczeniu produktów, należy fizycznie rozdzielić obszary procesu przed i po amplifikacji i upewnić się, że są wyposażone w oddzielne przyrządy (np. pipety, końcówki do pipetowania, mieszadło wirowe i wirówka).
- ▶ Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Pomędzy kolejnymi próbkami, jak również dozowaniami odczynników, należy wymieniać końcówki do pipetowania. W odpowiednim momencie należy zmieszać próbki za pomocą pipety i poddać płytkę wirowaniu. Nie worteksować płytek. Zastosowanie końcówek odpornych na aerozole ogranicza ryzyko przeniesienia amplikonu, jak również zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami.

- ▶ Informacje o parze indeks-próbka muszą odpowiadać tym wpisanym dla przebiegu MiSeqDx. Niezgodności między informacjami o próbkach a układem na płytce mogą powodować dodatnie rozpoznanie próbki i nieprawidłowe dane w raporcie wyników.
- ▶ Przed przeprowadzeniem procedury płukania należy zawsze przygotować świeży 80% roztwór etanolu. Etanol może pochłaniać wodę z powietrza, wpływając na wyniki.
- ▶ Po zakończeniu etapu procedury z użyciem magnetycznej podstawki należy przestrzegać czasów suszenia, aby upewnić się, że etanol całkowicie wyparuje. Pozostałości etanolu mogą wpłynąć na wyniki kolejnych reakcji.
- ▶ Elementy testu należy przechowywać we wskazanej temperaturze w specjalnie wyznaczonych obszarach, z których jeden przeznaczony jest do fazy przed amplifikacją, a drugi po amplifikacji.
- ▶ Powtarzane cykle zamrażania i rozmrażania (do 6) elementów z opakowania 1 nie powodują ograniczeń wykorzystania testu.
- ▶ Nie mieszać puli oligonukleotydów mukowiscydozy z buforem do hybrydyzacji przed przechowywaniem. Po połączeniu pule nukleotydów mukowiscydozy staną się niestabilne, nawet w przypadku przechowywania ich w stanie zamrożonym.
- ▶ Zastosowanie termocyklerów z aktywnym chłodzeniem (np. Peltier, z chłodzeniem termoelektrycznym) nie jest zalecane do etapu hybrydyzacji. Etap chłodzenia biernego ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej hybrydyzacji.
- ▶ Polimerazę PCR należy zawsze dodawać do mieszaniny wyjściowej do reakcji PCR tuż przed użyciem. Nie wolno przechowywać mieszaniny wyjściowej po dodaniu do niej innych składników.
- ▶ Podczas etapu normalizacji biblioteki bardzo ważne jest ponowne utworzenie zawiesiny ze skupisk nośnika biblioteki. Ważne, aby w komorze przepływowej aparatu MiSeqDx uzyskać jednorodną gęstość klastra.
- ▶ Na etapie normalizacji biblioteki należy przestrzegać czasów inkubacji. Niewłaściwa inkubacja może mieć wpływ na reprezentację biblioteki oraz gęstość klastra.
- ▶ Ze względu na wielokrotne przenoszenie płytki i związane z tym ryzyko zanieczyszczenia należy upewnić się, że zawartość dołka nie wypływa poza dołek. Nie rozlewać zawartości dołka.
- ▶ Zalecenie wprowadzenia 250 ng DNA pozwala na zmianę ilości DNA. Działanie testu zależy od tego właśnie poziomu wejściowego.
- ▶ Brak rozpoznań w raporcie z testu dla wariantów w próbce wskazuje, że dane dla tej pozycji wariantu nie spełniły zdefiniowanych progów sekwencjonowania. Nie należy raportować wariantów bez rozpoznań, chyba że w wyniku powtórzenia testu zostaną uzyskane wartości zgodne ze zdefiniowanymi progami i nie będzie już braku rozpoznań.

## Akronimy

Tabela 13 Akronimy dotyczące zestawu do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep

Akronim	Definicja
AMP	Płytko amplifikacyjna (ang. AMplification Plate)
CLP	Płytko do czyszczenia (ang. CLean-up Plate)
DAL	Biblioteka amplikonów w rozcieńczeniu (ang. Diluted Amplicon Library)
FPU	Zespół płytki z filtrem (ang. Filter Plate Unit)
HYB	Płytko do hybrydyzacji (ang. HYBridization Plate)
LNP	Płytko do normalizacji biblioteki (ang. Library Normalization Plate)
NTC	Kontrola bez wzorca (ang. No Template Control)
PAL	Biblioteka spulowanych amplikonów (ang. Pooled Amplicon Library)
SGP	Płytko do przechowywania (ang. StoraGe Plate)

## Materiały dodatkowe

W sekcji pomocy dotyczącej testu TruSight do oznaczania wariantów genu mukowiscydozy na stronie internetowej firmy Illumina dostępne są: oprogramowanie, materiały szkoleniowe, informacje na temat zgodności produktu oraz poniższa dokumentacja. Zawsze należy sprawdzać, czy na stronach pomocy technicznej nie ma najnowszych wersji.

Źródło	Opis
<i>Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0 (nr dokumentu: 1000000100945)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące konfigurowania parametrów przebiegu sekwencjonowania i analiz przy użyciu modułu analitycznego do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0.
<i>Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0 (nr dokumentu: 1000000100946)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące konfigurowania parametrów przebiegu sekwencjonowania i analiz przy użyciu modułu analitycznego do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0.
<i>Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro Analysis Module Workflow Guide (Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro; nr dokumentu: 200017946)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące konfigurowania parametrów przebiegu sekwencjonowania i analiz przy użyciu modułu mikroanalitycznego do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0.
<i>Local Run Manager CF Clinical Seq 2.0 Micro Analysis Module Workflow Guide (Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro; nr dokumentu: 200017945)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące konfigurowania parametrów przebiegu sekwencjonowania i analiz przy użyciu modułu mikroanalitycznego do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0.
<i>Instrukcja obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx (nr dokumentu: 1000000011880)</i>	Zawiera instrukcje tworzenia przebiegu, monitorowania statusu, analizowania danych sekwencjonowania i przeglądania wyników na aparacie MiSeqDx.
<i>Instrukcja obsługi aparatu MiSeqDx dla oprogramowania MOS w wer. 2 (nr dokumentu: 1000000021961)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące konfiguracji i przeprowadzania przebiegów sekwencjonowania łącznie z procedurami konserwacji aparatu MiSeqDx.

## Uwagi dotyczące procedury

- ▶ Firma Illumina wymaga zastosowania jednej próbki DNA jako kontroli dodatniej oraz jednej kontroli ujemnej (kontroli bez wzorca [ang. no template control, NTC]) w każdym przebiegu definiowanym jako zestaw próbek przetwarzanych równolegle. Próbką DNA stanowiącą kontrolę dodatnią powinna być dobrze określona próbka z co najmniej jednym znanym wariantem CFTR. Firma Illumina zaleca stosowanie kontroli typu dzikiego. Kontroli typu dzikiego należy użyć jako próbek i nie powinna ona zastępować kontroli dodatniej ani ujemnej.
- ▶ Elementy testu należy przechowywać we wskazanej temperaturze w specjalnie wyznaczonych obszarach, z których jeden przeznaczony jest do fazy przed amplifikacją, a drugi po amplifikacji.
- ▶ Powtarzane cykle zamrażania i rozmrażania (do 6) elementów z opakowania 1 nie powodują ograniczeń wykorzystania testu.

## Przygotowywanie próbek

Przed przeprowadzeniem testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy lub testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy należy wyekstrahować DNA z krwi pełnej i oznaczyć je ilościowo.

- ▶ Można zastosować dowolną zatwierdzoną metodę ekstrakcji DNA.
- ▶ Ustalić ilość DNA za pomocą spektrofotometru. Upewnić się, że stosunek A260/A280 próbki DNA ma wartość > 1,5. Znormalizować próbkę DNA do 50 ng/μl. Każda próbka wymaga 5 μl DNA genomowego (łącznie 250 ng).

## Przepustowość pod względem próbek

W przypadku testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy oraz testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy przepustowość pod względem próbek może wynosić 24-96 próbek z zestawem odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 i 24-36 próbek z zestawem odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Startery indeksujące wykorzystywane w amplifikacji metodą PCR należy wybrać na podstawie żądanej ostatecznej przepustowości pod względem próbek, aby upewnić się, że w każdej bibliotece używana jest niepowtarzalna kombinacja indeksów.



UWAGA

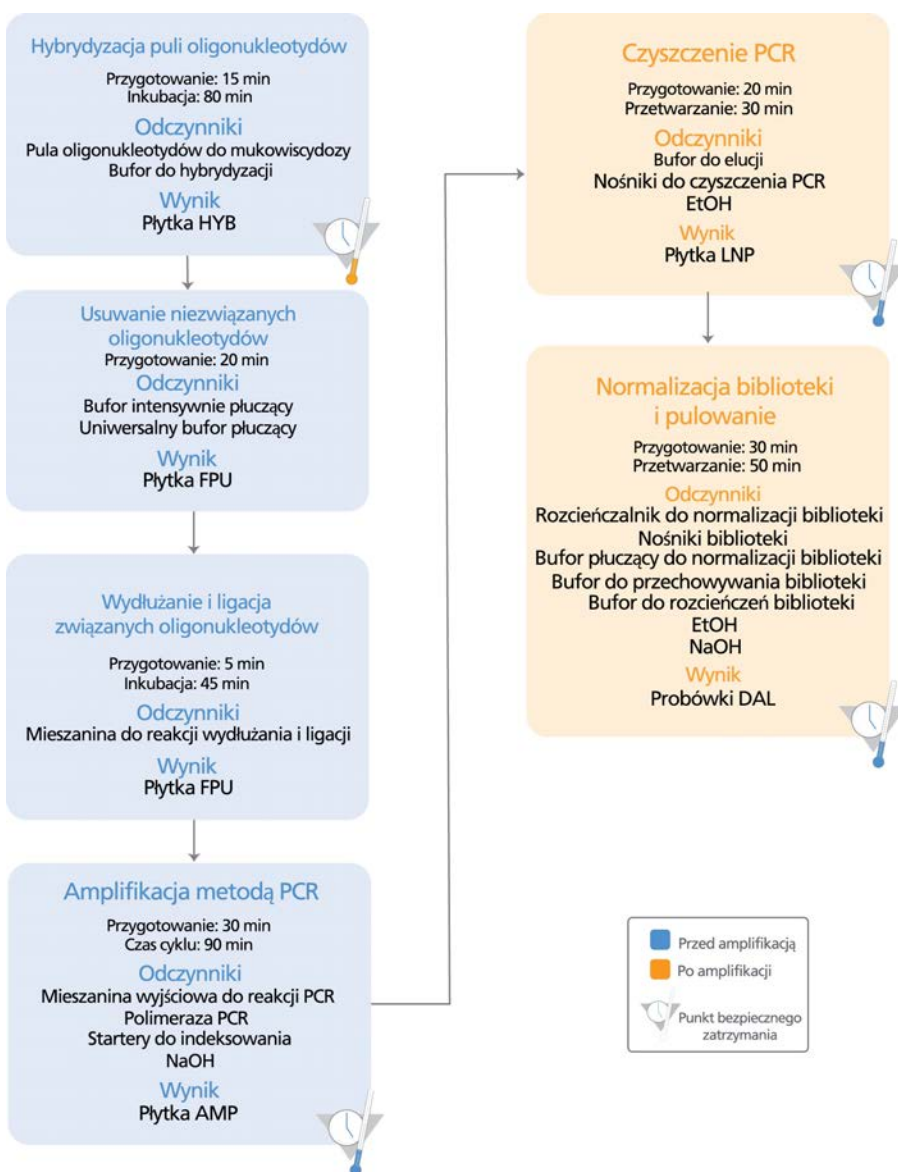
Wykonywanie przebiegu z liczbą próbek mniejszą niż 24 nie zostało zwalidowane przez firmę Illumina.

## Procedura przygotowania biblioteki

Poniższy diagram ilustruje procedurę przygotowania biblioteki do testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy. Etapy procedury przed amplifikacją obejmują: hybrydyzację puli oligonukleotydów, usunięcie niezwiązanych oligonukleotydów oraz wydłużanie i ligację związanych oligonukleotydów. W ramach etapu amplifikacji metodą PCR przygotowanie płytki PCR odbywa się na obszarze do procedur przed amplifikacją, natomiast badanie PCR w termocyklerze - na obszarze do procedur po amplifikacji. Etapy poamplifikacyjne obejmują: czyszczenie PCR oraz normalizację biblioteki i tworzenie puli.

Bezpieczne punkty zatrzymania są wskazane pomiędzy etapami.

Rysunek 1 Procedura przygotowania biblioteki do testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy



## Instrukcja użytkowania

Zestaw do przygotowywania biblioteki TruSight Cystic Fibrosis Library Prep obsługuje dwa rodzaje testów: test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i test Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy. Procedura pracy z zastosowaniem zestawu TruSight Cystic Fibrosis obejmuje wybór testu, przygotowanie biblioteki, sekwencjonowanie i mycie po przebiegu. Oprócz wyboru testu wszystkie pozostałe etapy procedury są identyczne dla obydwu testów.

## Wybór testu i konfiguracja przebiegu

- ▶ Używając testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, należy zapoznać się z punktem *Korzystanie z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0 na stronie 22.*
  - ▶ W tym punkcie można także znaleźć instrukcje dotyczące korzystania z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genotypu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro. W tym przypadku należy wybrać „**139 wariantów genotypu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro**” podczas tworzenia przebiegu zamiast „139 wariantów genotypu mukowiscydozy, wer. 2.0”.
- ▶ Używając testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, należy zapoznać się z punktem *Korzystanie z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0 na stronie 23.*
  - ▶ W tym punkcie można także znaleźć instrukcje dotyczące korzystania z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro. W tym przypadku należy wybrać „**sekwencjonowanie kliniczne genu mukowiscydozy, wer. 2.0 Micro**” podczas tworzenia przebiegu zamiast „sekwencjonowanie kliniczne genu mukowiscydozy, wer. 2.0”.

## Korzystanie z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0

### Ustawianie parametrów

- 1 Zalogować się do lokalnego menedżera przebiegu.
- 2 Wybrać polecenie **Create Run** (Utwórz przebieg), a następnie wybrać opcję **CF 139-Variant 2.0** (Oznaczenie 139 wariantów genu mukowiscydozy - wer. 2.0).
- 3 Wprowadzić nazwę przebiegu, która identyfikuje przebieg od sekwencjonowania po analizę. Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, spacje, znaki podkreślenia lub łączniki (maksimum 40 znaków).
- 4 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis przebiegu. Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, spacje, znaki podkreślenia lub łączniki (maksimum 150 znaków).
- 5 Wprowadzić numer serii i datę ważności zestawu do przygotowania biblioteki.

### Określanie próbek do przebiegu

Określić próbki do uwzględnienia w przebiegu za pomocą jednej z poniższych opcji.

- ▶ **Enter samples manually** (Ręczne wprowadzanie próbek) - należy użyć pustej tabeli na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu). Sugerowane dołki z próbkami zostaną podświetlone.
- ▶ **Import samples** (Importowanie próbek) - należy przejść do pliku zewnętrznego w formacie wartości rozdzielonych przecinkami (\*.csv). Szablon jest dostępny do pobrania na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu).

### Ręczne wprowadzanie próbek

- 1 Wprowadzić niepowtarzalną nazwę próbki w polu Sample Name (Nazwa próbki). Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, łączniki lub znaki podkreślenia (maksimum 40 znaków).
- 2 Kliknąć prawym klawiszem myszy, aby wybrać dodatnią i ujemną próbkę kontrolną. Aby można było zapisać przebieg, musi on zawierać co najmniej jedną dodatnią i jedną ujemną próbkę kontrolną.
- 3 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis próbki w odpowiadającej jej karcie Description (Opis). Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, łączniki lub znaki podkreślenia (maksimum 50 znaków).
- 4 **[Opcjonalnie]** Wybrać adapter Indeksu 1 z listy rozwijanej Index 1 (i7) (Indeks 1 [i7]). Krok ten jest opcjonalny, ponieważ kombinacje Indeksów i7 oraz i5 w domyślnym układzie wypełniane są automatycznie.
- 5 **[Opcjonalnie]** Wybrać adapter Indeksu 2 z listy rozwijanej Index 2 (i5) (Indeks 2 [i5]). Krok ten jest opcjonalny, ponieważ kombinacje indeksów i7 oraz i5 w domyślnym układzie wypełniane są automatycznie.
- 6 Wybrać ikonę **Print** (Drukuj), aby wyświetlić układ płytki.

- 7 Wybrać opcję **Print** (Drukuj), aby wydrukować układ płytki jako odniesienie do przygotowania bibliotek.
- 8 **[Opcjonalnie]** Wybrać opcję **Export** (Eksportuj), aby wyeksportować informacje o próbkach.
- 9 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).  
W przypadku wprowadzenia danych dla mniej niż 24 próbek zostanie wyświetlone okno Insufficient Sample (Niewystarczająca liczba próbek). Wybrać **Proceed** (Kontynuuj), aby kontynuować, lub **Cancel** (Anuluj), aby dokonać edycji próbek.



#### PRZESTROGA

Sekwencjonowania z zastosowaniem spulowanych bibliotek zawierających mniej niż 24 próbki nie zostało zwalidowane przez firmę Illumina.

#### Importowanie próbek

Informacje na temat próbek można zaimportować z dwóch rodzajów plików:

- ▶ Pliku z informacjami o próbkach wyeksportowanego uprzednio z modułu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, ver. 2.0, przy użyciu funkcji eksportowania.
- ▶ Szablону, który można wygenerować przy użyciu polecenia **Template** (Szablon) na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu). Plik szablonu zawiera właściwe nagłówki kolumn do zaimportowania danych wraz z symbolami zastępczymi w każdej kolumnie. Szablon należy dostosować przy użyciu zewnętrznego edytora:
  - 1 Dodać informacje o próbkach dla każdej próbki w przebiegu.
  - 2 Po wprowadzeniu wszystkich informacji usunąć pozostałe symbole zastępcze w nieużywanych komórkach.
  - 3 Zapisać plik szablonu.

Aby zaimportować informacje o próbkach:

- 1 Wybrać polecenie **Import Samples** (Importuj próbki), znaleźć plik docelowy na liście, a następnie wybrać go.
- 2 Wybrać ikonę **Print** (Drukuj), aby wyświetlić układ płytki.
- 3 Wybrać opcję **Print** (Drukuj), aby wydrukować układ płytki jako odniesienie do przygotowania bibliotek.
- 4 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).  
W przypadku wprowadzenia danych dla mniej niż 24 próbek zostanie wyświetlone okno Insufficient Sample (Niewystarczająca liczba próbek). Wybrać **Proceed** (Kontynuuj), aby kontynuować, lub **Cancel** (Anuluj), aby dokonać edycji próbek.



#### PRZESTROGA

Sekwencjonowania z zastosowaniem spulowanych bibliotek zawierających mniej niż 24 próbki nie zostało zwalidowane przez firmę Illumina.

#### Edycja przebiegu

Instrukcje na temat edycji informacji dotyczących przebiegu przed rozpoczęciem sekwencjonowania zawarto w *Instrukcji obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx (nr dokumentu: 100000011880)*.

Korzystanie z modułu analitycznego lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, ver. 2.0

#### Ustawianie parametrów

- 1 Zalogować się do lokalnego menedżera przebiegu.
- 2 Wybrać **Create Run** (Utwórz przebieg), a następnie **CF Clinical Seq 2.0** (Sekwencjonowanie kliniczne genu mukowiscydozy - ver. 2.0).  
Pojawi się okno podręczne z potwierdzeniem, że wybrana została opcja **CF Clinical Seq 2.0** (Sekwencjonowanie kliniczne genu mukowiscydozy - ver. 2.0).

**POTWIERDZIĆ PRZEBIEG SEKWENCJONOWANIA KLINICZNEGO GENU MUKOWISCYDOZY, WER. 2.0**

**i** Czy na pewno kontynuować **przebieg sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0** (test Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy)?

Uwaga: aby zmienić wybór przebiegu, nacisnąć przycisk Cancel (Anuluj) i dokonać innego wyboru.

Sprawdź, aby potwierdzić przebieg sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0

Anuluj Potwierdź

- 3 Zaznaczyć pole i wybrać opcję **Confirm** (Potwierdź), aby kontynuować, lub opcję **Cancel** (Anuluj), aby powrócić do ekranu głównego.
- 4 Wprowadzić nazwę przebiegu, która identyfikuje przebieg od sekwencjonowania po analizę.  
Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, spacje, znaki podkreślenia lub łączniki (maksimum 40 znaków).
- 5 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis przebiegu.  
Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, spacje, znaki podkreślenia lub łączniki (maksimum 150 znaków).
- 6 Wprowadzić numer serii i datę ważności zestawu do przygotowania biblioteki.

### Określanie próbek do przebiegu

Określić próbki do uwzględnienia w przebiegu za pomocą jednej z poniższych opcji.

- ▶ **Enter samples manually** (Ręczne wprowadzanie próbek) - należy użyć pustej tabeli na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu). Sugerowane dołki z próbkami zostaną podświetlone.
- ▶ **Import samples** (Importowanie próbek) - należy przejść do pliku zewnętrznego w formacie wartości rozdzielonych przecinkami (\*.csv). Szablon jest dostępny do pobrania na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu).

### Ręczne wprowadzanie próbek

- 1 Wprowadzić niepowtarzalną nazwę próbki w polu Sample Name (Nazwa próbki).  
Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, łączniki lub znaki podkreślenia (maksimum 40 znaków).
- 2 Kliknąć prawym klawiszem myszy, aby wybrać dodatnią i ujemną próbkę kontrolną.  
Aby można było zapisać przebieg, musi on zawierać co najmniej jedną dodatnią i jedną ujemną próbkę kontrolną.
- 3 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis próbki w odpowiadającej jej karcie Description (Opis).  
Nazwa może zawierać znaki alfanumeryczne, łączniki lub znaki podkreślenia (maksimum 50 znaków).
- 4 **[Opcjonalnie]** Wybrać adapter Indeksu 1 z listy rozwijanej Index 1 (i7) (Indeks 1 [i7]).  
Krok ten jest opcjonalny, ponieważ kombinacje Indeksów i7 oraz i5 w domyślnym układzie wypełniane są automatycznie.
- 5 **[Opcjonalnie]** Wybrać adapter Indeksu 2 z listy rozwijanej Index 2 (i5) (Indeks 2 [i5]).  
Krok ten jest opcjonalny, ponieważ kombinacje indeksów i7 oraz i5 w domyślnym układzie wypełniane są automatycznie.
- 6 Wybrać ikonę **Print** (Drukuj), aby wyświetlić układ płytki.
- 7 Wybrać opcję **Print** (Drukuj), aby wydrukować układ płytki jako odniesienie do przygotowania bibliotek.
- 8 **[Opcjonalnie]** Wybrać opcję **Export** (Eksportuj), aby wyeksportować informacje o próbce.
- 9 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).  
W przypadku wprowadzenia danych dla mniej niż 24 próbek zostanie wyświetlone okno Insufficient Sample (Niewystarczająca liczba próbek). Wybrać **Proceed** (Kontynuuj), aby kontynuować, lub **Cancel** (Anuluj), aby dokonać edycji próbek.



### PRZESTROGA

Sekwencjonowania z zastosowaniem spolowanych bibliotek zawierających mniej niż 24 próbki nie zostało zwalidowane przez firmę Illumina.



## Importowanie próbek

Informacje na temat próbek można zaimportować z dwóch rodzajów plików:

- ▶ Pliku z informacjami o próbkach wyeksportowanego uprzednio z modułu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, ver. 2.0, przy użyciu funkcji eksportowania.
- ▶ Szablону, który można wygenerować przy użyciu polecenia **Template** (Szablon) na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu). Plik szablonu zawiera właściwe nagłówki kolumn do zaimportowania danych wraz z symbolami zastępczymi w każdej kolumnie. Szablon należy dostosować przy użyciu zewnętrznego edytora:
  - 1 Dodać informacje o próbce dla każdej próbki w przebiegu.
  - 2 Po wprowadzeniu wszystkich informacji usunąć pozostałe symbole zastępcze w nieużywanych komórkach.
  - 3 Zapisać plik szablonu.

Aby zaimportować informacje o próbce:

- 1 Wybrać polecenie **Import Samples** (Importuj próbki), znaleźć plik docelowy na liście, a następnie wybrać go.
- 2 Wybrać ikonę **Print** (Drukuj), aby wyświetlić układ płytki.
- 3 Wybrać opcję **Print** (Drukuj), aby wydrukować układ płytki jako odniesienie do przygotowania bibliotek.
- 4 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).

W przypadku wprowadzenia danych dla mniej niż 24 próbek zostanie wyświetlone okno Insufficient Sample (Niewystarczająca liczba próbek). Wybrać **Proceed** (Kontynuuj), aby kontynuować, lub **Cancel** (Anuluj), aby dokonać edycji próbek.



### PRZESTROGA

Sekwencjonowania z zastosowaniem spulowanych bibliotek zawierających mniej niż 24 próbki nie zostało zwalidowane przez firmę Illumina.

## Edycja przebiegu

Instrukcje na temat edycji informacji dotyczących przebiegu przed rozpoczęciem sekwencjonowania zawarto w *Instrukcji obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx (nr dokumentu: 1000000011880)*.

## Przygotowanie bibliotek



### UWAGA

Procedury przygotowania biblioteki do testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy są identyczne.

## Hybrydyzacja puli oligonukleotydów

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ 96-dołkowa płytka do PCR
- ▶ Próbki genomowego DNA (gDNA)
- ▶ Bufor do hybrydyzacji
- ▶ Dodatnia próbka kontrolna
- ▶ Pula oligonukleotydów do mukowiscydozy
- ▶ Bufor TE
- ▶ Samoprzylepna uszczelka z folii aluminiowej

## Przygotowanie

### 1 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Bufor do hybrydyzacji	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie, aby cały osad został całkowicie rozpuszczony, a następnie krótkie wirowanie próbek, aby zebrać ciecz.
Pula oligonukleotydów do mukowiscydozy	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie, aby cały osad został całkowicie rozpuszczony, a następnie krótkie wirowanie próbek, aby zebrać ciecz.

- 2 Doprowadzić próbki gDNA i próbkę będącą kontrolą dodatnią do temperatury pokojowej.
- 3 Ustawić w bloku grzejnym z 96 dołkami temperaturę 95°C.
- 4 Podgrzać inkubator do temperatury 37°C.

## Procedura

- 1 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako HYB.
- 2 Przygotować płytkę z próbkami zgodnie z grafiką dotyczącą płytki wydrukowaną z oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu.
- 3 Działając zgodnie z układem płytki wygenerowanym z oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu, dodać 5 µl kontroli ujemnej (np. buforu TE) do odpowiedniego dołka płytki HYB.
- 4 Dodać 5 µl próbki lub kontroli w stężeniu 50 ng/µl (łącznie 250 ng) do odpowiednich dołków płytki HYB.
- 5 Dodać 5 µl puli oligonukleotydów związanych z mukowiscydozą do każdego dołka z próbką.
- 6 Dodać 40 µl buforu do hybrydyzacji do każdej próbki na płytce HYB.
- 7 Delikatnie pipetować w górę i w dół 3-5 razy w celu zmieszania.
- 8 Zamknąć płytkę HYB i odwirować z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę.
- 9 Umieścić płytkę HYB w bloku podgrzanym do temperatury 95°C i inkubować przez 1 minutę.
- 10 Obniżyć ustawienie temperatury bloku grzejnego do 40°C i kontynuować inkubację do momentu, aż blok osiągnie temperaturę 40°C (ok. 80 minut).  
Stopniowe schładzanie jest kluczowe, aby uzyskać odpowiednią hybrydyzację.

## PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA

Gdy temperatura bloku grzejnego osiągnie 40°C, płytka HYB będzie stabilna w stałej temperaturze 40°C przez 2 godziny.

## Usuwanie niezwiązanych oligonukleotydów

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Mieszanina do reakcji wydłużania i ligacji
- ▶ Płytkę z filtrem
- ▶ Bufor intensywnie płuczący
- ▶ Uniwersalny bufor płuczący
- ▶ Płytkę MIDI

## Przygotowanie

### 1 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Mieszanina do reakcji wydłużania i ligacji	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.
Bufor intensywnie płuczący	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie. Upewnić się, że całość osadu została rozpuszczona.
Uniwersalny bufor płuczący	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.

### 2 Złożyć zespół płytki filtrującej (FPU) **od góry do dołu**:

- wieczko,
- płytka z filtrem,
- kołnierz adaptera,
- płytka MIDI.

### 3 Przeprowadzić mycie wstępne membrany płytki z filtrem zgodnie z poniższym opisem.

- a Do każdego dołka dodać 45 µl buforu intensywnie płuczącego.
- b Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem i wirować przez 5 minut przy 2400 × g i temperaturze 20°C.

### 4 Sprawdzić, czy ze wszystkich dołków płytki z filtrem zawartość odpływa w całości. Jeśli bufor płuczący nie odpływa całkowicie, przeprowadzić ponowne wirowanie z prędkością 2400 × g w temperaturze 20°C do momentu, aż całość cieczy przepłynie (dodatkowe 5-10 minut).



#### PRZESTROGA

Bardzo istotne jest kontrolowanie temperatury wirowania podczas procedury mycia. Jeśli temperatura osiągnie 25°C, może spowodować wyższą swoistość reakcji podczas wiązania starterów. W rzadkich przypadkach, jeśli próbki mają SNV w regionach wiązania starterów, wyższa swoistość może prowadzić do wypadania alleli.

## Procedura

- 1 Usunąć płytkę HYB z bloku grzejnego i odwirować z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę.
- 2 Za pomocą zestawu pipet wielokanałowych, ustawionych na 55 µl, przenieść całą objętość każdej próbki do odpowiednich dołków na płytce z filtrem.
- 3 Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem i wirować przez 5 minut przy 2400 × g i temperaturze 20°C.
- 4 Przeprowadzić mycie płytki z filtrem zgodnie z poniższym opisem.
  - a Do każdego dołka z próbką dodać 45 µl buforu intensywnie płuczącego.
  - b Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem i wirować przez 5 minut przy 2400 × g i temperaturze 20°C.
- 5 Umyć płytkę po raz **drugi**.
- 6 Jeśli bufor płuczący nie odpływa całkowicie, przeprowadzić ponowne wirowanie z prędkością 2400 × g w temperaturze 20°C do momentu, aż całość cieczy odpłynie (dodatkowe 5-10 minut).
- 7 Usunąć całość cieczy, która spłynęła, i ponownie zmontować FPU.
- 8 Do każdego dołka z próbką dodać 45 µl uniwersalnego buforu płuczającego.
- 9 Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem i wirować przez 10 minut z prędkością 2400 × g w temperaturze 20°C.
- 10 Upewnić się, że po wirowaniu całość cieczy spłynęła. W razie potrzeby powtórzyć wirowanie.

## Wydłużanie i ligacja związanych oligonukleotydów

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Mieszanina do reakcji wydłużania i ligacji
- ▶ Samoprzylepna uszczelka z folii aluminiowej

### Procedura

- 1 Do każdego dołka na próbkę na płytce z filtrem dodać 45 µl mieszaniny do reakcji wydłużania i ligacji.
- 2 Zapieczętować płytkę z filtrem, a następnie przykryć pokrywką.
- 3 Inkubować płytkę FPU we wstępnie nagrzanym inkubatorze o temperaturze 37°C przez 45 minut.
- 4 W czasie inkubacji płytki FPU przygotować płytkę AMP (przeznaczoną do amplifikacji) zgodnie z opisem w poniższej sekcji.

## Amplifikacja metodą PCR

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ 96-dołkowa płytka do PCR
- ▶ Zamknięcie płytki do PCR
- ▶ Startery do indeksowania (A501-A508 i A701-A712)
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Mieszanina wyjściowa do reakcji PCR
- ▶ Polimeraza PCR
- ▶ Probówka stożkowa o pojemności 15 ml

### Przygotowanie

- 1 Określić, jakie startery indeksujące mają zostać użyte zgodnie z graficznym układem płytki w oprogramowaniu lokalnego menedżera przebiegu.
- 2 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Startery do indeksowania (A501-A508 i A701-A712)	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Worteksować w celu zmieszania, a następnie krótko wirować.
Polimeraza PCR	Od -25°C do -15°C	Pozostawić w zamrażarce do czasu, gdy będzie trzeba przygotować roztwór roboczy PCR.
Mieszanina wyjściowa do reakcji PCR	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Worteksować w celu zmieszania, a następnie krótko wirować.

- 3 Przygotować świeży roztwór 0,05 N NaOH, dodając 25 µl 10 N NaOH do 4975 µl wody pozbawionej RNazy/DNazy.
- 4 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako AMP.
- 5 Dodać startery indeksujące do płytki AMP w następujący sposób.
  - a Dodać 4 µl wybranych starterów indeksujących 2 (A501-A508) do odpowiedniego dołka na płytce AMP.
  - b Usunąć oryginalne białe nasadki, a następnie zastosować nowe białe nasadki.
  - c Dodać 4 µl wybranych starterów indeksujących 1 (A701-A712) do odpowiedniego rzędu na płytce AMP.
  - d Usunąć oryginalne pomarańczowe nasadki, a następnie zastosować nowe pomarańczowe nasadki.

6 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Polimeraza PCR	Od -25°C do -15°C	Wyjąć z miejsca przechowywania i krótko wirować. Przejść natychmiast do następnego kroku. Jeśli polimeraza PCR będzie potrzebna do dodatkowych przygotowań, wrócić do miejsca przechowywania po przygotowaniu roztworu roboczego PCR.

7 Przygotować roztwór roboczy PCR w opisany poniżej sposób.



**UWAGA**

W poniższej instrukcji podano objętości wymagane do przetworzenia 96 próbek. W przypadku mniejszej liczby próbek należy odpowiednio dostosować objętości, aby zachować odczynniki.

- a W przypadku 96 próbek dodać 56 µl polimerazy PCR do 2,8 ml mieszaniny wyjściowej do reakcji PCR.
- b Odwrócić 20-krotnie w celu zmieszania.

Roztwór roboczy PCR pozostaje stabilny w temperaturze pokojowej przez 10 minut.

**Procedura**

- 1 Wyjąć zespół płytki z filtrem z inkubatora, a następnie zdjąć zamknięcie.
- 2 Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem, a następnie wirować przez 2 minuty z prędkością 2400 × g w temperaturze 20°C.
- 3 Dodać 25 µl 0,05 N NaOH do każdego dołka na płytce z filtrem.
- 4 Pipetować w górę i w dół 5-6 razy.
- 5 Nałożyć wieczko na płytkę z filtrem i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
- 6 Podczas inkubacji płytki z filtrem przenieść 22 µl mieszaniny wyjściowej do reakcji PCR do każdego dołka płytki AMP zawierającego startery indeksujące.
- 7 Przenieść próbki poddane elucji z filtra na płytkę AMP zgodnie z poniższym opisem.
  - a Pipetować próbki w pierwszej kolumnie płytki z filtrem w górę i w dół 5-6 razy.
  - b Przenieść 20 µl z płytki z filtrem do odpowiedniej kolumny płytki AMP.
  - c Delikatnie pipetować w górę i w dół 5-6 razy, aby dokładnie połączyć DNA z mieszaniną wyjściową do reakcji PCR.
  - d Powtórzyć czynności związane z przenoszeniem dla pozostałych kolumn z płytki z filtrem na płytkę AMP.
- 8 Zamknąć płytkę AMP i zabezpieczyć wałkiem gumowym.
- 9 Wirować przez 1 minutę z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C.
- 10 Przenieść płytkę AMP do obszaru po amplifikacji.
- 11 Przeprowadzić reakcję PCR, stosując następujący program w termocyklerze:
  - ▶ 95°C przez 3 minuty
  - ▶ 25 cykli:
    - ▶ 95°C przez 30 sekund
    - ▶ 62°C przez 30 sekund
    - ▶ 72°C przez 60 sekund
  - ▶ 72°C przez 5 minut
  - ▶ Utrzymać w temperaturze 10°C

**PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA**

Jeśli bezpośrednio później nie jest przeprowadzane czyszczenie PCR, płytkę AMP można pozostawić w termocyklerze przez noc. Można ją też przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C przez maksymalnie 48 godzin.

## Czyszczenie PCR

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Probówka stożkowa o pojemności 50 ml
- ▶ Samoprzylepne, jednorazowe zamknięcia płytki
- ▶ Dwie płytki MIDI
- ▶ Bufor do elucji
- ▶ Nośniki do czyszczenia PCR

### Przygotowanie

- 1 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Nośniki do czyszczenia PCR	Od 2°C do 8°C	Odstawić na 30 minut w celu doprowadzenia do temperatury pokojowej.

- 2 Przygotować dla 96 próbek świeży 80% roztwór EtOH, wykorzystując 36 ml absolutnego EtOH i 9 ml wody pozbawionej DNazy/RNazy. Dokładnie wymieszać.



#### UWAGA

W przypadku przetwarzania liczby próbek mniejszej niż 96 należy odpowiednio dostosować objętości odczynników, aby zachować odczynniki.

### Procedura

- 1 Płytkę AMP odwirować z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę.
- 2 Oznaczyć nową płytkę MIDI jako CLP.
- 3 Odwrócić 10 razy nośniki do czyszczenia PCR. Poddać intensywnemu worteksowaniu, a następnie odwrócić jeszcze 10 razy. Przeprowadzić kontrolę wzrokową roztworu, aby upewnić się, że nośniki zostały ponownie zawieszane.
- 4 Dodać 45 µl nośników do czyszczenia PCR do każdego dołka płytki CLP.
- 5 Przenieść całość produktu reakcji PCR z każdego dołka płytki AMP do odpowiedniego dołka w płytce CLP.
- 6 Zamknąć i wstrząsać we wstrząsaczu mikroplatek przez 2 minuty z prędkością 1800 obr./min.
- 7 Inkubować w temperaturze pokojowej bez wstrząsania przez 10 minut.
- 8 Umieścić płytkę na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
- 9 Gdy płytkę CLP znajduje się na podstawce magnetycznej, ostrożnie odprowadzić i usunąć nadsącz.
- 10 Umyć nośniki zgodnie z poniższym opisem.
  - a Pozostawić na podstawce magnetycznej i dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH do każdego dołka.
  - b Odczekać co najmniej 30 sekund lub do momentu, gdy nadsącz stanie się przejrzysty.
  - c Odprowadzić całość nadsączu z każdego dołka i usunąć.
- 11 Przepłukać kulki po raz **drugi**.
- 12 Za pomocą zestawu pipet wielokanałowych P20, ustawionych na 20 µl, usunąć nadmiar roztworu EtOH.
- 13 Zdjąć płytkę CLP z podstawki magnetycznej i suszyć nośniki na powietrzu przez 10 minut.
- 14 Dodać 30 µl buforu do elucji do każdej próbki.
- 15 Zamknąć płytkę CLP i wstrząsać we wstrząsaczu mikroplatek przez 2 minuty z prędkością 1800 obr./min. Po wstrząsaniu sprawdzić, czy nastąpiło ponowne zawieszenie próbek. Jeśli nie, powtórzyć ten krok.
- 16 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
- 17 Umieścić płytkę CLP na podstawce magnetycznej i odczekać, aż nadsącz stanie się przejrzysty (ok. 2 minuty).
- 18 Oznaczyć nową płytkę MIDI jako LNP.
- 19 Przenieść 20 µl nadsączu z każdego dołka płytki CLP do odpowiedniego dołka w płytce LNP.

- 20 **[Opcjonalnie]** Przenieść pozostałe 10 µl nadsącza z płytki CLP na nową płytkę i oznaczyć ją nazwą oraz datą przebiegu. Przechowywać tę płytkę w temperaturze od -25°C do -15°C do momentu zakończenia sekwencjonowania i analizy danych. Oczyszczone produkty PCR można wykorzystać w razie niepowodzenia oznaczenia próbek.

## PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA

Przerwywając pracę w tym momencie, należy zamknąć płytkę LNP i odwirować z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę. Płytkę pozostanie stabilna przez maksymalnie 3 godziny w temperaturze od 2°C do 8°C.

## Normalizacja biblioteki i pulowanie

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Probówka stożkowa o pojemności 15 ml
- ▶ 96-dołkowa płytka do PCR
- ▶ Probówki do mikrowirówki
- ▶ Nośniki biblioteki
- ▶ Bufor do rozcieńczeń biblioteki
- ▶ Rozcieńczalnik do normalizacji biblioteki
- ▶ Bufor płuczący do normalizacji biblioteki
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Woda pozbawiona RNazy/DNazy

### Przygotowanie

- 1 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Nośniki biblioteki	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.
Bufor do rozcieńczeń biblioteki	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie. Upewnić się, że całość osadu została rozpuszczona.
Rozcieńczalnik do normalizacji biblioteki	Od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie. Upewnić się, że całość osadu została rozpuszczona.
Bufor płuczący do normalizacji biblioteki	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Przeprowadzić intensywne worteksowanie.

- 2 Przygotować świeży roztwór 0,1 N NaOH, dodając 50 µl 10 N NaOH do 4950 µl wody pozbawionej RNazy/DNazy.

### Procedura

- 1 Zmieszać w poniższy sposób rozcieńczalnik do normalizacji bibliotek z nośnikami biblioteki w świeżej 15 ml probówce stożkowej.



#### UWAGA

W poniższej instrukcji podano objętości wymagane do przetworzenia 96 próbek. W przypadku mniejszej liczby próbek należy odpowiednio dostosować objętości, aby zachować odczynniki.

- a W przypadku 96 próbek dodać 4,4 ml rozcieńczalnika do normalizacji bibliotek.
- b Przeprowadzić intensywne worteksowanie nośników biblioteki przez 1 minutę, stosując sporadyczne odwracanie, do momentu ponownego zawieszenia nośników i braku skupisk na dnie probówki po jej odwróceniu.
- c Pipetować nośniki biblioteki w górę i w dół 10-krotnie w celu ponownego zawieszenia.



#### PRZESTROGA

Bardzo istotne jest doprowadzenie do pełnego zawieszenia skupiska nośników biblioteki na dnie próbówki. Zastosowanie końcówek P1000 do pipet zapewnia, że nośniki zostaną ponownie zawieszony w jednolity sposób, a na dnie próbki nie pozostaną skupiska nośników. Ma to kluczowe znaczenie dla osiągnięcia jednorodnej gęstości klastra w komorze przepływowej aparatu.

- d W przypadku 96 próbek pipetować 800 µl nośników biblioteki do próbówki stożkowej zawierającej rozcieńczalnik do normalizacji bibliotek.
  - e Zmieszać, odwracając próbówkę 15-20 razy.
- 2 Dodać 45 µl rozcieńczalnika do normalizacji bibliotek/ roboczego roztworu nośników biblioteki do każdego dołka na płytce LNP.
  - 3 Zamknąć i wstrząsać we wstrząsaczu mikroplatek przez 30 minut przy 1800 obr./min.



#### UWAGA

Jeśli sekwencjonowanie ma być przeprowadzone tego samego dnia, należy rozpocząć rozmrażanie kasety odczytników. Należy postępować zgodnie z instrukcją rozmrażania kasety z odczytnikiem MiSeqDx podanymi w punkcie *Przygotowanie do sekwencjonowania biblioteki na stronie 33*.

- 4 Umieścić płytkę LNP na podstawce magnetycznej i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (ok. 2 minuty).
- 5 Gdy płytkę LNP znajduje się na podstawce magnetycznej, ostrożnie odprowadzić i usunąć nadsącz.
- 6 Zdjąć płytkę LNP z podstawki magnetycznej i umyć nośniki środkiem płuczącym do normalizacji bibliotek:
  - a do każdego dołka z próbką dodać 45 µl środka płuczącego do normalizacji bibliotek;
  - b zamknąć płytkę LNP i wstrząsać we wstrząsaczu mikroplatek przez 5 minut przy 1800 obr./min;
  - c umieścić płytkę na podstawce magnetycznej na co najmniej 2 minuty lub do momentu, gdy nadsącz stanie się przejrzysty;
  - d ostrożnie odprowadzić i usunąć nadsącz.
- 7 Powtórzyć procedurę z zastosowaniem środka płuczącego do normalizacji bibliotek, jak opisano w poprzednim kroku.
- 8 Za pomocą zestawu pipet wielokanałowych P20, ustawionych na 20 µl, usunąć nadmiar środka płuczącego do normalizacji bibliotek.
- 9 Zdjąć płytkę LNP z podstawki magnetycznej, a następnie dodać 30 µl 0,1 N NaOH do każdego dołka.
- 10 Zamknąć płytkę LNP i wstrząsać we wstrząsaczu mikroplatek przez 5 minut przy 1800 obr./min.
- 11 Podczas 5-minutowej elucji oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako SGP.
- 12 Do każdego dołka dodać 30 µl buforu do przechowywania bibliotek.
- 13 Upewnić się, że wystąpiło pełne ponowne zawieszenie wszystkich próbek w płytce LNP. W przypadku braku pełnego ponownego zawieszenia próbek należy delikatnie pipetować próbki w górę i w dół lub lekko stuknąć płytką o blat, a następnie wstrząsać przez kolejne 5 minut.
- 14 Umieścić płytkę LNP na podstawce magnetycznej na co najmniej 2 minuty.
- 15 Za pomocą zestawu pipet wielokanałowych, ustawionych na 30 µl, przenieść nadsącz z płytki LNP na płytkę SGP. Delikatnie pipetować w górę i w dół 5 razy w celu zmieszania.
- 16 Zamknąć płytkę SGP, a następnie wirować przez 1 minutę z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C.
- 17 Poddać bufor do rozcieńczania bibliotek worteksowaniu i upewnić się, że całość osadu została całkowicie rozpuszczona. Przeprowadzić krótkie wirowanie w celu zebrania zawartości.
- 18 Oznaczyć nową próbówkę do mikrowirówki jako PAL.
- 19 Określić liczbę próbek do utworzenia puli sekwencjonowania. W puli przeznaczony do sekwencjonowania może znajdować się maksymalnie 96 próbek.
- 20 Przenieść 5 µl każdej biblioteki przeznaczony do sekwencjonowania z każdego dołka płytki SGP, kolumna po kolumnie, do odpowiedniego dołka podstawki PCR z ośmioma probówkami.
- 21 Przenieść zawartość podstawki PCR z ośmioma probówkami do próbówki PAL. Worteksować próbówkę PAL do pełnego zmieszania.



- 22 Zamknąć płytkę SGP samoprzylepnym zamknięciem i oznaczyć nazwą oraz datą przebiegu.



**UWAGA**

Płytkę SGP można przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez okres do 3 dni i w razie potrzeby użyć jej do ponownego spulowania bibliotek.

- 23 Oznaczyć 2-3 nowe próbki do mikrowirówki jako DAL.  
24 Dodać do próbek DAL 585 µl buforu do rozcieńczania bibliotek.  
25 Przenieść 9 µl PAL do każdej próbki DAL zawierającej bufor do rozcieńczania bibliotek.  
26 Pipetować w górę i w dół 3-5 razy w celu przepłukania końcówki i upewnić się, że został przeniesiony cały materiał.

**PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA**

Jeśli bezpośrednio później nie następuje sekwencjonowanie w aparacie MiSeqDx, można przechowywać próbki DAL w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 28 dni.

## Sekwencjonowanie bibliotek



**UWAGA**

Procedury sekwencjonowania biblioteki do testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy są identyczne.

## Przygotowanie do sekwencjonowania biblioteki

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 lub zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro
- ▶ Bufor do rozcieńczeń biblioteki
- ▶ Biblioteka kontroli wewnętrznej PhiX

### Przygotowanie

- 1 Ustawić temperaturę 96°C w bloku grzejnym odpowiednim dla próbek do wirówki o pojemności 1,5 ml.
- 2 Przygotować kąpiel z lodem w pojemniku na lód.
- 3 Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje
Bufor do rozcieńczeń biblioteki	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie. Upewnić się, że całość osadu została rozpuszczona. Wirować przez krótki czas i włożyć do kąpieli z lodem. W razie potrzeby z zestawem odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 dostarczany jest dodatkowy bufor do rozcieńczeń biblioteki.
Kontrola wewnętrzna PhiX	Od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Włożyć do kąpieli z lodem.
Kaseta zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3	Od -25°C do -15°C	Pozostawić kasetę odczynników do rozmrożenia w kąpieli wodnej w temperaturze pokojowej na około 90 minut lub do momentu całkowitego rozmrożenia. Dodatkowe informacje na temat przygotowania kasety z odczynnikami można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu MiSeqDx dla oprogramowania MOS wer. 2 (nr dokumentu: 100000021961).
Komora przepływowa MiSeqDx Flow Cell	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Dodatkowe informacje na temat przygotowania komory przepływowej można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu MiSeqDx dla oprogramowania MOS wer. 2 (nr dokumentu: 100000021961).
Roztwór MiSeqDx SBS Solution (PR2)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Dodatkowe informacje na temat przygotowania roztworu SBS można znaleźć w instrukcji obsługi aparatu MiSeqDx dla oprogramowania MOS wer. 2 (nr dokumentu: 100000021961).

## Denaturowanie i rozcieńczanie kontroli wewnętrznej PhiX

### Materiały eksploatacyjne

- ▶ Woda pozbawiona DNazy/RNazy
- ▶ 10 N NaOH
- ▶ Bufor do rozcieńczeń biblioteki
- ▶ Biblioteka kontroli wewnętrznej PhiX
- ▶ Bufor TE
- ▶ Probówka stożkowa o pojemności 15 ml
- ▶ Probówki do mikrowirówki

### Przygotowanie

- 1 W probówce stożkowej połączyć następujące objętości, aby przygotować 0,1 N roztwór NaOH:
  - ▶ Woda pozbawiona DNazy i RNazy (2475 µl)
  - ▶ Podstawowy roztwór 10 N NaOH (25 µl)
- 2 Odwrócić probówkę kilkakrotnie w celu zmieszania.



#### PRZESTROGA

Stosowanie świeżo rozcieńczonego NaOH jest kluczowe, aby nastąpiło pełne denaturowanie próbek do generacji klastra w aparacie MiSeqDx.

Jeśli przygotowanie kontroli PhiX nastąpi tego samego dnia co normalizacja biblioteki, można wykorzystać ten sam roztwór podstawowy 0,1 N NaOH.

- 3 Należy połączyć następujące objętości w celu rozcieńczenia biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX do 2 nM:
  - ▶ 10 nM roztwór biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX (2 µl)
  - ▶ 1X bufor TE (8 µl)
- 4 Należy połączyć następujące objętości w celu przygotowania 1 nM roztworu biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX:
  - ▶ 2 nM roztwór biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX (10 µl)
  - ▶ 0,1 N NaOH (10 µl)

- 5 Przeprowadzić krótkie worteksowanie w celu wymieszania.
- 6 Wirować 1 nM roztwór kontroli wewnętrznej PhiX z prędkością 280 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę.
- 7 Inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej, aby doprowadzić do denaturowania roztworu biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX na pojedyncze nici.
- 8 W nowej próbówce do mikrowirówek połączyć następujące objętości w celu przygotowania 20 pM roztworu biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX:
  - ▶ Denaturowany roztwór biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX (2 µl)
  - ▶ Wstępnie schłodzony bufor do rozcieńczeń biblioteki (98 µl)



#### PRZESTROGA

Denaturowany roztwór 20 pM biblioteki kontroli wewnętrznej PhiX można przechowywać przez 3 tygodnie w temperaturze od -25°C do -15°C jako porcje do jedнокrotnego użytku.

### Przygotowanie próbek do sekwencjonowania

- 1 Kontynuować z jedną próbką DAL do sekwencjonowania.
- 2 Jeśli próbka DAL była przechowywana w stanie zamrożonym, należy ją całkowicie rozmrozić i zmieszać przez pipetowanie w górę i w dół.
- 3 Jeśli kontrola wewnętrzna PhiX 20 pM była przechowywana w stanie zamrożonym, wyjąć porcję do jedнокrotnego użytku, całkowicie rozmrozić, wymieszać przez worteksowanie, a następnie krótko wirować.
- 4 Do próbki DAL wlać 6 µl 20 pM kontroli wewnętrznej PhiX.
- 5 Pipetować w górę i w dół 3-5 razy w celu przepłukania końcówki i upewnić się, że został przeniesiony cały materiał.
- 6 Wymieszać zawartość próbki DAL, worteksując ją z największą prędkością.
- 7 Probówkę DAL odwirować z prędkością 1000 × g w temperaturze 20°C przez 1 minutę.
- 8 Probówkę DAL inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
- 9 Po zakończeniu inkubacji probówkę DAL odwrócić 1-2 razy, a następnie natychmiast włożyć ją do kąpieli z lodem.
- 10 Probówkę DAL (spulowane biblioteki) pozostawić w kąpieli z lodem przez 5 minut.

### Ładowanie spulowanych bibliotek do kasety

- 1 Za pomocą nowej końcówki pipety o pojemności 1 ml przedziurawić folię zabezpieczającą zbiorniczek kasety odczytników z oznaczeniem Load Samples (Ładowanie próbek).
- 2 Wkropić pipetą 600 µl z próbki DAL do zbiorniczka z oznaczeniem Load Samples (Ładowanie próbek). Nie dotykać foliowego zamknięcia.
- 3 Po załadowaniu próbki sprawdzić, czy w zbiorniczku nie ma pęcherzyków powietrza. Jeśli występują pęcherzyki, delikatnie stuknąć kasetą o blat w celu uwolnienia pęcherzyków.
- 4 Przejść bezpośrednio do konfiguracji przebiegu za pomocą interfejsu oprogramowania MiSeq Operating Software (MOS). Dodatkowe informacje na temat przeprowadzania konfiguracji przebiegu na aparacie MiSeqDx można znaleźć w *instrukcji obsługi aparatu MiSeqDx dla oprogramowania MOS ver. 2 (nr dokumentu: 100000021961)*.

### Płukanie po przebiegu, w tym płukanie linii wzorcowej

Po zakończeniu sekwencjonowania zdecydowanie zaleca się przeprowadzenie płukania po przebiegu wraz z płukaniem linii wzorcowej.



#### PRZESTROGA

Brak przeprowadzenia płukania linii wzorcowej może wpłynąć na liczbę rozpoznań kontroli ujemnej w kolejnym przebiegu.



#### UWAGA

Procedura płukania po przebiegu jest identyczna w przypadku testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy i testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy.

## Materiały eksploatacyjne

- ▶ Probówki do mikrowirówki
- ▶ Woda o jakości laboratoryjnej
- ▶ Tween 20
- ▶ Podchloryn sodu o stężeniu 5%
- ▶ Probówka MiSeq



### OSTRZEŻENIE

**Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

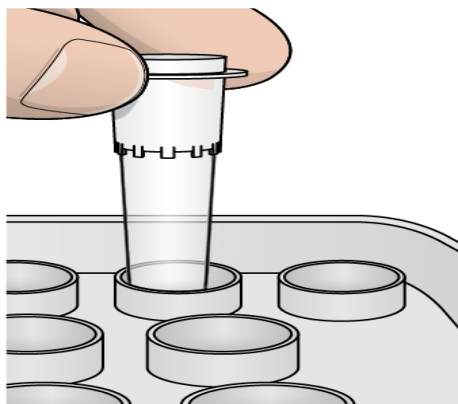
## Przygotowanie

- 1 Przygotować w opisany poniżej sposób świeży roztwór płuczący, zawierający odczynnik Tween 20 i wodę o jakości laboratoryjnej.
  - a Dodać 5 ml 100% roztworu odczynnika Tween 20 do 45 ml wody o jakości laboratoryjnej. W ten sposób uzyskuje się 10% roztwór odczynnika Tween 20.
  - b Dodać 25 ml 10% roztworu odczynnika Tween 20 do 475 ml wody o jakości laboratoryjnej. W ten sposób uzyskuje się 0,5% roztwór płuczący na bazie odczynnika Tween 20.
  - c Odwrócić pięć razy, aby zmieszać.
- 2 Przygotować w opisany poniżej sposób świeży roztwór płuczący podchlorynu sodu z wodą o jakości laboratoryjnej.
  - a Dodać 36 µl 5% roztworu podchlorynu sodu do 864 µl wody o jakości laboratoryjnej. W ten sposób uzyskuje się roztwór podchlorynu sodu o stosunku rozcieńczenia 1:25.
  - b Dodać 50 µl roztworu podchlorynu sodu o stosunku rozcieńczenia 1:25 do 950 µl wody o jakości laboratoryjnej w probówce MiSeq.
- 3 Zastosowanie odpowiedniego stężenia podchlorynu sodu ma istotne znaczenie. Należy pamiętać o sprawdzeniu na etykiecie produktu informacji o stężeniu procentowym roztworu podchlorynu sodu. Jeśli stężenie będzie zbyt wysokie, generacja klastra może zakończyć się niepowodzeniem w kolejnych przebiegach. W przypadku braku roztworu podchlorynu sodu o stężeniu 5% należy przygotować 1 ml 0,01% roztworu podchlorynu sodu w wodzie o jakości laboratoryjnej. Nie używać podchlorynu sodu do mycia konserwacyjnego ani mycia zabezpieczającego.
- 4 Przygotować w opisany poniżej sposób składniki świeżego roztworu płuczącego.
  - a Dodać 6 ml roztworu płuczącego do każdego zbiornika na tacy do mycia.
  - b Dodać 350 ml roztworu płuczącego do tryskawki o objętości 500 ml.

## Procedura

- 1 Wprowadzić probówkę MiSeq zawierającą 0,01% roztwór płuczący podchlorynu sodowego w pozycji 17 tacki do mycia, tak aby szyjka probówki zrównała się z tacką. Probówka wyprze odczynnik Tween 20 i wodny roztwór płuczący o jakości laboratoryjnej z pozycji 17.

Rysunek 2 Probówka MiSeq w pozycji 17 tacki do mycia



#### PRZESTROGA

Należy pamiętać, aby wprowadzać probówkę MiSeq z podchlorynem sodowym tylko w pozycji 17 tacki. Wprowadzenie próbki w innej pozycji może spowodować nieudaną generację klastra w kolejnych przebiegach.

- 2 Po zakończeniu przebiegu wybrać opcję **Start Wash** (Rozpocznij płukanie). Oprogramowanie automatycznie podnosi dozowniki w chłodziarce odczynników.
- 3 Na ekranie płukania po przebiegu wybrać opcję **Perform optional template line wash** (Przeprowadź opcjonalne płukanie linii wzorcowej).
- 4 Otworzyć drzwiczki przedziału odczynników oraz drzwiczki chłodziarki odczynników i wysunąć z chłodziarki używaną kasetę odczynników.
- 5 Wsuwać tacę do mycia do chłodziarki odczynników aż do wycucia oporu, a następnie zamknąć drzwiczki chłodziarki.
- 6 Unieść uchwyt dozownika przed butelkę z roztworem MiSeqDx SBS Solution do sekwencjonowania przez syntezę oraz butelkę na zlewki i zablokować go.
- 7 Wyjąć butelkę z roztworem MiSeqDx SBS Solution do sekwencjonowania przez syntezę i zastąpić ją butelką na roztwór płuczący.
- 8 Wyjąć butelkę na zlewki i wylać jej zawartość zgodnie z przepisami. Ponownie umieścić butelkę na zlewki w przedziale odczynników.
- 9 Powoli obniżyć uchwyt dozownika. Upewnić się, że dozowniki zostały opuszczone do butelki na roztwór płuczący i butelki na zlewki.
- 10 Zamknąć drzwiczki przedziału odczynników.
- 11 Wybrać **Next** (Dalej). Rozpocznie się mycie po przebiegu.
- 12 Po zakończeniu mycia pozostawić w aparacie używaną komorę przepływową, tacę do mycia i tryskawkę zawierającą pozostały roztwór płuczący.
- 13 Dozowniki pozostaną na dole i jest to sytuacja normalna. Pozostawić nieużyty roztwór płuczący na tacy do mycia i w butelce, aby zapobiec wyschnięciu dozowników i przedostaniu się powietrza do systemu.

## Ponowna analiza zsekwencjonowanych bibliotek

Po sekwencjonowaniu można przeprowadzić ponowną analizę tego samego zbioru sekwencjonowania, postępując zgodnie z procedurą *ponownego umieszczania analizy w kolejce* opisaną w *instrukcji obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx* (nr dokumentu: 100000011880). Ponowne umieszczanie analizy w kolejce jest ograniczone do modułu pierwotnie użytego do przeprowadzenia sekwencjonowania. Ponowne umieszczanie analizy w kolejce pozwala zmieniać dane próbki i tworzyć nowe raporty.



#### UWAGA

Stworzone pule bibliotek wykorzystywane do sekwencjonowania muszą zawierać 24-96 próbek. Raporty dotyczące podzbioru próbek można uzyskać, wprowadzając mniej próbek podczas konfiguracji ponownego umieszczania w kolejce. Raporty będą tworzone tylko dla próbek wprowadzonych podczas konfiguracji ponownego umieszczania w kolejce.

## Opcje ponownego testowania dla spulowanych bibliotek

W teście TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy wykorzystywana jest ta sama procedura przygotowania biblioteki co w teście TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genotypu mukowiscydozy. Procedura przygotowania biblioteki wymaga wybrania testu przed rozpoczęciem. Natomiast w przypadku gdy spulowane biblioteki (próbki DAL) wymagają przeprowadzenia dodatkowych testów (np. powtórzenia sekwencjonowania lub diagnostyki automatycznej za pomocą innego testu TruSight), można użyć próbek DAL według potrzeb bez powtarzania procedury przygotowania biblioteki. Przeprowadzając test ponownie, należy postępować zgodnie z następującą procedurą:



#### UWAGA

Stworzone pule bibliotek wykorzystywane do sekwencjonowania muszą zawierać co najmniej 24-96 próbek. Raporty dotyczące podzbioru próbek można uzyskać, wprowadzając mniej próbek podczas konfiguracji sekwencjonowania. Wszystkie spulowane próbki zostaną poddane sekwencjonowaniu, ale raporty będą generowane tylko dla próbek wprowadzonych podczas konfiguracji sekwencjonowania.

- 1 Przeprowadzić konfigurację zgodnie z instrukcją w punkcie *Wybór testu i konfiguracja przebiegu na stronie 22*.
- 2 Przeprowadzić sekwencjonowanie bibliotek zgodnie z instrukcją w punkcie *Sekwencjonowanie bibliotek na stronie 33*.
- 3 Po zakończonym sekwencjonowaniu umyć aparat MiSeqDx zgodnie z instrukcją w punkcie *Płukanie po przebiegu, w tym płukanie linii wzorcowej na stronie 35*.

## Interpretacja wyników testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

- ▶ Test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy został opracowany w sposób umożliwiający wykrywanie 139 wariantów genu CFTR, w tym zalecanych przez ACMG (Tabela 2).
- ▶ W raporcie z testu podane są nazwy próbek i genotypy dotyczące każdego wariantu wykrytego dla danej próbki.
  - ▶ Wszystkie próbki są analizowane pod kątem 134 wariantów powodujących mukowiscydozę oraz wariantu R117H zalecanego przez ACMG. W raporcie z testu podawane są wyłącznie wykryte zmutowane allele.
  - ▶ Wariant PolyTG/PolyT jest raportowany wyłącznie wtedy, gdy w próbce zostanie zidentyfikowany wariant R117H. U pacjentów z wariantem R117H należy przeprowadzić dodatkowe badanie w celu ustalenia, czy wariant PolyTG/PolyT, który może wpływać na fenotyp kliniczny [np. 12-13 (TG) lub 5T], jest w orientacji cis czy trans w stosunku do wariantu R117H.



#### UWAGA

Genotyp PolyTG/PolyT jest określany za pomocą testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy na podstawie liczenia odczytów najczęściej występujących genotypów. Ze względu na cyfrowy charakter sekwencjonowania nowej generacji test może uzyskać wysoką dokładność na podstawie wielu obserwacji, inaczej niż w innych rozwiązaniach opartych na sekwencjonowaniu, w których jest wykorzystywanych zaledwie kilka obserwacji.

- ▶ Gdy w próbce znajdzie się homozygotyczny genotyp F508del lub I507del, to jeśli zostanie wykryty co najmniej jeden z trzech łagodnych polimorfizmów I506V, I507V i F508C, informacja ta jest raportowana w odniesieniu do próbki. Jeśli wszystkie trzy łagodne polimorfizmy są typu dzikiego, w raporcie wskazane jest, że warianty I506V, I507V i F508C nie są obecne w próbce.



**UWAGA**

Ponieważ niniejszy test jest testem opartym na sekwencjonowaniu, raportowanie trzech łagodnych polimorfizmów nie zakłóca raportowania delekcji F508del lub I507del. W związku z tym do wykrytego wyniku nie będą nanoszone żadne poprawki.

- ▶ Gdy próbka zostanie zidentyfikowana jako heterozygotyczna i zostaną w niej wykryte zarówno allele typu dzikiego, jak i zmutowane, wynik dotyczący genotypu zostanie zaraportowany jako HET.
- ▶ Gdy próbka zostanie zidentyfikowana jako homozygotyczna i zostanie w niej wykryty tylko zmutowany allel, wynik dotyczący genotypu zostanie zaraportowany jako HOM.
- ▶ Jeśli w próbce nie zostanie zidentyfikowany wariant, w raporcie zostanie wskazany brak wykrycia wariantów w panelu.
- ▶ W raporcie z testu podana jest informacja o liczbie rozpoznań w każdej próbce. Liczba rozpoznań jest obliczana jako liczba pozycji/regionów wariantu spełniających zdefiniowany wcześniej próg ufności podzielony przez całkowitą liczbę analizowanych pozycji/regionów.
  - ▶ W przypadku próbek wymagających warunkowego raportowania w obliczeniach liczby rozpoznań są uwzględniane również dodatkowe analizowane warianty.
  - ▶ Wszystkie warianty, w których zdefiniowana wcześniej wartość ufności jest poniżej progu, są raportowane jako No call (Brak rozpoznania). Zaleca się powtórny analizę próbki.
- ▶ Wynik próbki jest uznawany za ważny tylko wtedy, gdy liczba rozpoznań wynosi  $\geq 99\%$ . Gdy liczba rozpoznań wynosi  $< 99\%$ , wynik jest raportowany jako Fail (Niepowodzenie) i analizę próbki należy powtórzyć.



**UWAGA:**

Jeśli liczba rozpoznań próbki wynosi  $< 50\%$ , wynik zostanie zaraportowany jako Fail (Niepowodzenie), a w raporcie znajdzie się komentarz Sample Failed (Niepowodzenie próbki). Informacje o wariancie nie są wyświetlane. Analizę próbki należy powtórzyć.

- ▶ Zaleca się, aby warianty, których analiza została potwierdzona przy użyciu próbek syntetycznych (patrz tabela dokładności), były weryfikowane przez użytkownika za pomocą zatwierdzonej metody porównawczej przed zaraportowaniem wyniku pierwszego pacjenta w zakresie takich wariantów.
- ▶ Jeśli w próbce zostaną zidentyfikowane więcej niż dwa warianty, zaleca się, aby użytkownik zweryfikował wynik poprzez ponowną analizę próbki za pomocą testu TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów mukowiscydozy i świeżego ekstraktu gDNA w celu wykluczenia zanieczyszczenia krzyżowego próbki.



**UWAGA**

Gdy liczba wykrytych wariantów wyniesie 2 lub więcej, należy rozważyć zastosowanie fazowania haplotypu.

- ▶ Wszystkich interpretacji dotyczących wariantów powinien dokonywać wykwalifikowany kliniczny genetyk molekularny lub inna osoba o równoważnych kwalifikacjach, zgodnie z miejscowymi procedurami<sup>15</sup>. Interpretacja może być oparta m.in. na następujących źródłach: baza danych CFTR2<sup>11</sup>, praca Sosnaya<sup>13</sup>, wytyczne ACMG z 2004 roku<sup>1</sup> oraz opinia kolegium ACOG z 2011 roku<sup>2</sup>. Informacje o sposobie obliczania i prezentacji wyników oraz opis treści w tekstowym pliku raportowym można znaleźć w instrukcjach dotyczących oprogramowania analitycznego dołączonego do aparatu MiSeqDx. Informacje na temat lokalnego menedżera przebiegu znajdują się w dokumentach *Instrukcja obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx (nr dokumentu: 100000011880)* i *Instrukcja wykonywania procedur analitycznych przy użyciu modułu lokalnego menedżera przebiegu do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, wer. 2.0 (nr dokumentu: 1000000100945)*.

## Interpretacja wyników testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Test Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy jest przeznaczony do sekwencjonowania wszystkich regionów kodujących białko w genie CFTR w obrębie 27 eksonów, 5-30 nukleotydów otaczającej sekwencji intronowej, ok. 100 nt otaczającej sekwencji przy końcu 5' i 3' regionów UTR, a także dwóch głębokich mutacji intronowych (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T). Dokładne informacje o sekwencjonowanych regionach zawiera [Tabela 3](#). Dodatkowo raport z testu obejmuje również wariant PolyTG/PolyT oraz dwie duże delecje (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- ▶ W raporcie z testu podane są nazwy próbek i genotypy dotyczące każdego wariantu wykrytego dla danej próbki.
  - ▶ Odnosnie do każdego wariantu podawana jest współrzędna genomowa, nazwa cDNA wg nomenklatury Towarzystwa ds. Zmienności Genomu Ludzkiego (ang. Human Genome Variation Society, HGVS) oraz nazwa białka (jeśli jest dostępna).
  - ▶ Typ wariantu jest wskazywany jako wariant pojedynczego nukleotydu (SNV), wariant delecja/insercja (DIV), wariant PolyTG/PolyT lub duża delecja (DEL).
  - ▶ Rozpoznanie genotypu (zarówno hetero-, jak i homozygotycznego) można wywnioskować z informacji o nukleotydzie „referencyjnym”, który zapewnia sekwencję referencyjną na tej współrzędnej genomowej, a także z opisu „wyniku”, który zapewnia informacje o dwóch allelach w pozycji genomowej w próbce. Na przykład jeśli odniesienie to „G”, a wynikiem jest „A/G”, wskazuje to na zmianę G>A na tej współrzędnej genomowej oraz że genotyp jest heterozygotyczny w odniesieniu do tego allelu wariantu. Podobnie jeśli odniesienie to „G”, a wynikiem jest „T/T”, wskazuje to na zmianę G>T na tej współrzędnej genomowej oraz że genotyp jest homozygotyczny w odniesieniu do tego allelu wariantu.
  - ▶ Informacja o głębokości sekwencjonowania w pozycji wariantu jest podana w polu Depth (Głębokość), natomiast częstotliwość allelu - w sekcji Frequency (Częstotliwość).
- ▶ W raporcie z testu podana jest informacja o liczbie rozpoznań w każdej próbce. Liczba rozpoznań jest obliczana jako liczba pozycji/regionów wariantu spełniających zdefiniowany wcześniej próg ufności podzielona przez całkowitą liczbę analizowanych pozycji/regionów.
  - ▶ Współrzędna genomowa dotycząca dowolnej pozycji lub dowolnego regionu, dla którego wartość ufności znajduje się poniżej progu, jest podawana osobno w sekcji Coordinates not called (Współrzędne bez rozpoznań). Użytkownik powinien ocenić pozycje, które nie zostały rozpoznane, na podstawie odpowiednich informacji o wariantach, aby zidentyfikować warianty, które mogły zostać pominięte wraz z ich częstotliwością występowania w populacji w celu ustalenia, czy wymagane jest powtórzenie analizy próbki.
- ▶ Wynik próbki jest uznawany za ważny tylko wtedy, gdy liczba rozpoznań wynosi  $\geq 99\%$ . Gdy liczba rozpoznań wyniesie poniżej 99%, wynik zostanie zaraportowany jako Fail (Niepowodzenie). W takim przypadku analizę próbki należy powtórzyć.
- ▶ Zaleca się, aby wszystkie warianty, których wyniki odbiegają od zatwierdzonych w badaniu dokładności (patrz punkt [Dokładność na stronie 62](#)), były weryfikowane przez użytkownika za pomocą zatwierdzonej metody porównawczej przed zaraportowaniem wyniku pierwszego pacjenta w zakresie takich wariantów.



### UWAGA

Gdy liczba wykrytych wariantów wyniesie 2 lub więcej, należy rozważyć zastosowanie fazowania haplotypu.

- ▶ Wszystkich interpretacji dotyczących wariantów powinien dokonywać wykwalifikowany kliniczny genetyk molekularny lub inna osoba o równoważnych kwalifikacjach, zgodnie z miejscowymi procedurami<sup>15</sup>. Interpretacja może być oparta m.in. na następujących źródłach: baza danych CFTR2<sup>11,12</sup>, praca Sosnaya<sup>13</sup>, wytyczne ACMG z 2004 roku<sup>1</sup> oraz opinia kolegium ACOG z 2011 roku<sup>2</sup>.

Informacje o sposobie obliczania i prezentacji wyników oraz opis treści w tekstowym pliku raportowym można znaleźć w instrukcjach dotyczących oprogramowania analitycznego dołączonego do aparatu MiSeqDx. Informacje na temat lokalnego menedżera przebiegu znajdują się w dokumentach *Instrukcja obsługi oprogramowania lokalnego*



*menedżera przebiegu do systemu MiSeqDx (nr dokumentu: 100000011880) i Instrukcja wykonywania procedur analitycznych przy użyciu modułu lokalnego menedżera przebiegu do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy, wer. 2.0 (nr dokumentu: 1000000100946).*

- ▶ W oprogramowaniu lokalnego menedżera przebiegu genetyk wprowadzi wartość interpretacyjną odnośnie do każdego wariantu zaraportowanego z próbki, używając do tego menu rozwijanego. Wybór wartości interpretacyjnych jest następujący: CF-causing (Powoduje mukowiscydozę), Mutation of varying clinical consequence (Mutacja o różnych skutkach klinicznych), Mutation of unknown significance (Mutacja o nieznanym znaczeniu) lub Non-CF causing (Nie powoduje mukowiscydozy). Wprowadzona wartość zostanie dołączona do pliku z wynikami i wyświetlona w kolumnie interpretacyjnej raportu z testu sekwencjonowania klinicznego.

## Procedury kontroli jakości

Zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną należy ocenić materiał kontrolny pod kątem ewentualnych różnic pod względem metod obróbki krwi i procedur technicznych stosowanych w laboratorium użytkownika, które mogą powodować istotną rozbieżność w wynikach.

- **Kontrola ujemna (NTC lub kontrola bez wzorca)** - podczas każdego przebiegu wymagane jest stosowanie kontroli ujemnej w celu wykrycia ewentualnych przypadków zanieczyszczenia. Współczynnik rozpoznania dla kontroli ujemnej powinien wynosić mniej niż 10%. Jeśli kontrola ujemna generuje współczynnik rozpoznania na poziomie > 10%, a dla poprzedniego przebiegu przeprowadzono płukanie linii wzorcowej, to podczas oznaczania mogło wystąpić zanieczyszczenie. Oznaczenie uznaje się za nieudane i należy je w całości powtórzyć, zaczynając od przygotowania biblioteki. Ujemna próbka kontrolna zostanie zaraportowana jako udana, jeśli wygeneruje współczynnik rozpoznania na poziomie  $\leq 10\%$ , i nieudana, jeśli współczynnik rozpoznania wyniesie > 10%.



### UWAGA

Bardzo ważne jest, aby po każdym sekwencjonowaniu przeprowadzić płukanie linii wzorcowej, aby zapobiec podwyższeniu współczynnika rozpoznania kontroli ujemnej. Jeśli współczynnik rozpoznania kontroli ujemnej wynosi > 10%, a w poprzednim przebiegu nie przeprowadzono płukania linii wzorcowej, zalecane jest wykonanie przez operatora mycia po przebiegu wraz z płukaniem linii wzorcowej, a następnie powtórzenie sekwencjonowania.

- **Kontrole dodatnie** - próbka z dodatnią kontrolą DNA jest wymagana w każdym przebiegu. Próbka z dodatnią kontrolą DNA powinna być dobrze scharakteryzowaną próbką z co najmniej jednym wariantem CTFR<sup>16</sup>. Firma Illumina zaleca stosowanie rotacji kontroli dodatnich zgodnie ze standardami i wytycznymi ACMG z 2008 r. dotyczącymi testowania mutacji genu mukowiscydozy<sup>17</sup> oraz standardami klinicznymi ACMG z 2013 r. dla laboratoriów dotyczącymi sekwencjonowania nowej generacji<sup>18</sup>. Próbka z kontrolą dodatnią musi generować oczekiwany genotyp. Jeśli kontrola dodatnia wygeneruje genotyp inny niż oczekiwany, oznacza to, że mógł wystąpić błąd w śledzeniu próbki lub nieprawidłowa rejestracja starterów indeksujących. Cały proces oznaczenia musi zostać powtórzony, począwszy od przygotowania biblioteki. Dodatnia próbka kontrolna zostanie zaraportowana jako udana, jeśli wygeneruje współczynnik rozpoznania na poziomie  $\geq 99\%$ , lub nieudana, jeśli współczynnik rozpoznania wyniesie < 99%.
- **Kontrola typu dzikiego** - zastosowanie próbki kontrolnej z DNA typu dzikiego jest zalecane podczas każdego przebiegu. Próbka kontrolna typu dzikiego powinna być dobrze scharakteryzowaną próbką, która nie zawiera żadnych wariantów CFTR. Próbka kontrolna typu dzikiego musi generować oczekiwany genotyp. Jeśli próbka kontrolna typu dzikiego wygeneruje genotyp inny niż oczekiwany, będzie to oznaczać, że mógł wystąpić błąd w śledzeniu próbki lub nieprawidłowa rejestracja starterów indeksujących. Cały proces oznaczenia musi zostać powtórzony, począwszy od przygotowania biblioteki.
- Wynik próbki jest uznawany za ważny tylko wtedy, gdy liczba rozpoznania wynosi  $\geq 99\%$ . Gdy liczba rozpoznania wyniesie poniżej 99%, wynik zostanie zaraportowany jako Fail (Niepowodzenie). W takim przypadku analizę próbki należy powtórzyć.
- Przed pierwszym zastosowaniem produktu w swoim laboratorium użytkownik powinien sprawdzić działanie testu, przeprowadzając analizę kilku próbek dodatnich i ujemnych o znanej charakterystyce działania.
- Wszystkie czynności wymagane w związku z kontrolą jakości należy przeprowadzić zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi oraz warunkami akredytacji.

## Charakterystyka działania testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

Charakterystykę działania testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy podano na podstawie badań, w których zastosowano test MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy. Równoważność pomiędzy testami TruSight i MiSeqDx opisano w części *Równoważność działania z testem Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genotypu mukowiscydozy na stronie 61.*

### Dokładność

Dokładność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy oceniono na podstawie analizy 500 próbek zawierających szeroki zakres wariantów CFTR pochodzących z czterech różnych źródeł. Podstawowym źródłem danych do oceny dokładności było badanie dokładności klinicznej przeprowadzone z zastosowaniem panelu obejmującego 366 próbek. Większość próbek (n = 355) składała się ze zarchiwizowanego, zanimizowanego materiału klinicznego gDNA, wyizolowanego z ludzkiej krwi. Pozostałe 11 próbek uzyskano z ogólnodostępnego materiału pochodzącego z linii komórkowych.

Dane z tego badania uzupełniono danymi na temat dokładności pochodzącymi z 68 próbek z linii komórkowych, które oceniono w badaniu odtwarzalności, 14 próbek klinicznych z badania analitycznego oceny metody ekstrakcji oraz 52 próbek syntetycznych plazmidów. Syntetyczne plazmidy zaprojektowano w taki sposób, aby zawierały kontekst genomowy rzadkich wariantów. W jednej konstrukcji zawierały one od jednego do dziewięciu wariantów. Poddano je linearyzacji, rozcieńczono w celu uzyskania liczby kopii odpowiadającej DNA genomowemu i zmieszano z próbkami ludzkiego DNA genomowego typu dzikiego przy równoważnej liczbie kopii, aby imitować próbkę heterozygotyczną.

Wyniki genotypowania dla 137 lokalizacji SNV/małych polimorfizmów typu indel, w tym regionu PolyTG/PolyT, porównano z analizą sekwencjonowania dwukierunkowego metodą Sangera. Jako metodę referencyjną dla dwóch dużych delecji w panelu zastosowano dwa zwalidowane testy oparte na metodzie PCR. W każdym z testów PCR typu dupleks zastosowano dwa zestawy starterów w celu rozróżnienia pomiędzy genotypem typu dzikiego, heterozygotycznym i homozygotycznym. Jeden z zestawów starterów został zaprojektowany w taki sposób, aby otaczał punkty złamań delecji, natomiast drugi wzmacniał region objęty delecją. Dwa produkty wykrywano poprzez rozdział wg rozmiaru w żelu agarozowym.

Testy PCR zwalidowano za pomocą panelu z 28 próbkami (22 próbki dla każdej delecji) składającego się z próbek DNA genomowego pochodzącego z linii komórkowych i krwi oraz syntetycznych plazmidów obejmujących genotypy WT, HET i HOM dla każdej dużej delecji. Oceniając produkty PCR na żelu agarozowym, potwierdzono 100% swoistość i odtwarzalność testów PCR dla wszystkich badanych próbek. Dokładność testów PCR potwierdzono za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Wyniosła ona 100% dla wszystkich próbek.

Za pomocą trzech miar statystycznych określono dokładność dla każdego genotypu. Zgodność dodatnią (PA) obliczono dla genotypu każdego wariantu, dzieląc liczbę próbek ze zgodnym rozpoznaniem wariantu przez całkowitą liczbę próbek z tym wariantem zgodnie z identyfikacją za pomocą metod referencyjnych. Zgodność ujemną (NA) obliczono we wszystkich pozycjach typu dzikiego (WT), dzieląc liczbę zgodnych pozycji WT przez całkowitą liczbę pozycji WT zgodnie z metodami referencyjnymi. Zgodność ogólną (OA) obliczono we wszystkich zaraportowanych pozycjach, dzieląc liczbę zgodnych WT i pozycji wariantów przez całkowitą liczbę zaraportowanych pozycji zgodnie z ustaleniami za pomocą metod referencyjnych.

Wartość PA na poziomie genotypu w teście Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy wynosiła 100%. Wartość NA dla wszystkich pozycji WT wynosiła > 99,99%, wartość OA dla wszystkich zaraportowanych pozycji również wynosiła > 99,99%. Wszystkie wyniki testu dotyczą pierwszego badania.

Tabela 14 Ogólna dokładność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznania dodatnie (warianty)			Rozpoznania ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Rozpoznanie ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Rozpoznanie ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Rozpoznanie ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Rozpoznanie ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Rozpoznanie ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1,6kb A>G	SNV	c.1679+1,6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A <sup>fl</sup>	SNV	c.2490+1G>T <sup>fl</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



Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Nazwa cDNA	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznania dodatnie (warianty)			Rozpoznania ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
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>ε</sup>	PolyTGPolyT	c.1210-12T[5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	nd.	100
I506V <sup>¶</sup>	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	nd.	100	100
I507V <sup>¶</sup>	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	nd.	100	100
F508C <sup>¶</sup>	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	nd.	100	100
Łącznie			67522		557		66965	1	0	100	>99,99	>99,99

DIV oznacza wariant delecja/insercja.

\* W raporcie z sekwencjonowania metodą Sangera wariant P205S wskazano jako heterozygotyczny w odniesieniu do próbki klinicznej. Natomiast analiza danych zebranych metodą Sangera wskazuje, że wariant był w rzeczywistości homozygotyczny i zaraportowany nieprawidłowo. Aparat MiSeqDx zaraportował wariant jako homozygotyczny.

§ Próbką syntetyczną, heterozygotyczną w odniesieniu do eksonu 8, została zaraportowana jako heterozygotyczna w odniesieniu do wariantu CFTR dele22,23. Dalsza analiza wykazała, że taki wynik był prawdopodobnie skutkiem zanieczyszczenia o niskim poziomie.

^ Pierwotna syntetyczna próbka heterozygotyczna została uznana za przygotowaną nieprawidłowo. Gdy ją następnie zbadano po ponownym przygotowaniu i zastosowaniu tego samego plazmidu - została wykryta.

ε Gdy wynik dla wariantu R117H będzie dodatni, zostaje dodatkowo zaraportowany wariant PolyTG/PolyT.

¶ W przypadku jednego homozygotycznego wariantu F508del zaraportowano dodatkowo trzy inne nukleotydy typu dzikiego (tj. warianty I506V, I507V, F508C), które nie zostały zidentyfikowane w próbce.

¶ Pierwotne badanie walidacyjne dotyczące testu obejmowało 2 syntetyczne próbki ze zmianą nukleotydu c.2490+1G>T na wariant 2622+1 G>A (dane zamieszczone w tabeli). Później przeprowadzono drugie badanie walidacyjne z zastosowaniem syntetycznej próbki zawierającej zmianę nukleotydu c.2490+1G>A w związku z faktyczną zmianą nukleotydu (c.2490+1G>A) powiązaną z tym wariantem.

Tabela 15 Dokładność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy w odniesieniu do wykrywania wariantów I506V, I507V i F508C.

Wariant (nazwa pospolita)	Łączna liczba rozpoznań na wariant	Rozpoznania dodatnie (warianty)			Rozpoznania ujemne (typ dziki)	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
		Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne						
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

Tabela 16 Dokładność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay o oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy w odniesieniu do wariantów PolyTG/PolyT

Genotyp PolyTG/PolyT	Liczba próbek klinicznych	Liczba próbek z linii komórkowych	Liczba próbek syntetycznych	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów*	Dokładność [%]
(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

Genotyp PolyTG/PolyT	Liczba próbek klinicznych	Liczba próbek z linii komórkowych	Liczba próbek syntetycznych	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów*	Dokładność [%]
(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
(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>łącznie**</b>		<b>448</b>		<b>4</b>	<b>3</b>	<b>98,44</b>

\* Próbek nie testowano ponownie.

^ Jeden z niezgodnych wyników pochodził z badania odtwarzalności. Wynik dotyczący PolyTG/PolyT w odniesieniu do próbki był zgodny we wszystkich 18 odtworzeniach, ale niezgodny z sekwencjonowaniem dwukierunkowym metodą Sangera.

\*\* Całkowita liczba próbek w przypadku wariantu PolyTG/PolyT wynosi 448, ponieważ wszystkie próbki syntetyczne (n = 52) zostały przygotowane poprzez połączenie linearyzowanych plazmidów z jedną z dwóch próbek z linii komórkowych, które były częścią badania odtwarzalności. Ponieważ raportowanie wariantu PolyTG/PolyT w odniesieniu do tych próbek syntetycznych skutkowałooby nadmiernym zaraportowaniem wariantu, próbki syntetyczne zostały wykluczone z analizy.

## Odtwarzalność

Odtwarzalność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy określono na podstawie badania z zastosowaniem ślepej próby przeprowadzonego na trzech stanowiskach. Każde stanowisko obsługiwało dwóch operatorów. Każdy z operatorów na poszczególnych stanowiskach przebadał dwa dobrze scharakteryzowane panele po 46 próbek, co dało łącznie 810 rozpoznań na stanowisko. Panele zawierały mieszaninę genomowego DNA z limfoblastowych linii komórkowych ze znanymi wariantami w genie *CFTR*, a także krew o obniżonej zawartości leukocytów zmieszana z limfoblastowymi liniami komórkowymi ze znanymi wariantami w genie *CFTR*. Próbkę krwi dostarczono w celu przeprowadzenia czynności ekstrakcji do przygotowania gDNA będącego materiałem wejściowym w procedurze oznaczenia.

Odsetek prawidłowych próbek, określany jako liczba próbek spełniających wymagania parametrów kontroli jakości w pierwszej próbie, wyniósł 99,9%.

Zgodność dodatnia na poziomie genotypu wyniosła dla wszystkich wariantów 99,77%. Zgodność ujemna dla wszystkich pozycji WT wyniosła 99,88%, tak samo jak zgodność ogólna dla wszystkich zaraportowanych pozycji. Wszystkie wyniki testu dotyczą pierwszego badania. W przypadku badania odtwarzalności nie wykonano powtórzenia oznaczenia.

Tabela 17 Odtwarzalność testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 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

Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3					
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 - brak	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3					
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	nd.	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	nd.	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	nd.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3					
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	nd.	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	nd.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	nd.	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	nd.	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	nd.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	nd.	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

Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3					
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	nd.	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	nd.	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



Panel	Nr próbki	Genotyp próbki	Warianty	Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko	Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty)			Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego)			Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów	Zgodność dodatnia (%)	Zgodność ujemna (%)	Zgodność ogólna (%)
					Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 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	nd.	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	394deIT (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
Łącznie				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

\* Lokacja typu dzikiego dotycząca wariantu N1303K w jednym powtórzeniu dała wynik nierozpoznanych nukleotydów ze względu na niewystarczające pokrycie.

^ Przy jednym powtórzeniu próbek 5 i 75 wskaźnik rozpoznania wyniósł 0%. Dalsze dochodzenie wykazało, że próbki mogły nie zostać umieszczone na płytce przed przygotowaniem biblioteki, ponieważ objętości próbek pozostałych w probówkach zgadzały się z objętością, która nie została usunięta.

\*\* Dochodzenie wykazało, że próbki 9 i 10 zostały prawdopodobnie zamienione przez operatora przed przygotowaniem biblioteki.

§ Lokalizacja typu dzikiego dotycząca wariantu M1V w jednym powtórzeniu każdej z dwóch próbek dała wynik nierozpoznanych nukleotydów ze względu na niewystarczające pokrycie.

Tabela 18 Dodatkowe informacje nt. odtwarzalności badanych wariantów

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Region genu CFTR
PolyTG/PolyT	Złożony DIV*	Intron 9
2183AA>G	Złożony DIV*	Ekson 14
CFTR dele2,3	DEL	Intron 1-Intron 3
1154insTC	DIV*	Ekson 8
I507del	DIV*	Ekson 11
F508del	DIV*	Ekson 11
2143delT	DIV*	Ekson 14
3659delC	DIV*	Ekson 22
3876delA	DIV*	Ekson 23
394delTT	DIV w regionie homopolimerycznym*	Ekson 3
1078delT	DIV w regionie homopolimerycznym*	Ekson 8
2184delA	DIV w regionie homopolimerycznym*	Ekson 14
3905insT	DIV w regionie homopolimerycznym*	Ekson 23
E60X	SNV	Ekson 3
R75X	SNV	Ekson 3
G85E	SNV	Ekson 3
E92X	SNV	Ekson 4
R117H	SNV	Ekson 4
Y122X	SNV	Ekson 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Ekson 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Ekson 6
G330X	SNV	Ekson 8
R334W	SNV	Ekson 8
I336K	SNV	Ekson 8
R347P	SNV	Ekson 8
R347H	SNV	Ekson 8
A455E	SNV	Ekson 10
Q493X	SNV	Ekson 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Ekson 12
S549N	SNV	Ekson 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Ekson 12
G551D	SNV	Ekson 12
R553X	SNV	Ekson 12
R560T	SNV	Ekson 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12

Wariant (nazwa pospolita)	Typ wariantu	Region genu CFTR
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Ekson 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X (C>A)	SNV	Ekson 20
M1101K	SNV	Ekson 20
R1158X	SNV	Ekson 22
R1162X	SNV	Ekson 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Ekson 23
N1303K	SNV	Ekson 24

\* DIV oznacza wariant delecja/insercja.

## Ekstrakcja DNA

Wykorzystując preparat krwi pełnej z antykoagulantem EDTA, przeprowadzono ocenę, stosując trzy powszechnie stosowane, ogólnodostępne metody ekstrakcji: przy pomocy kulek magnetycznych, strącania alkoholem oraz izolacji przy użyciu kolumny z filtrem krzemionkowym. W badaniu wykorzystano łącznie 14 niepowtarzalnych próbek krwi obejmujących genotyp typu dzikiego i trzy genotypy zmutowane (trzy próbki z mutacją F508del, jedna próbka z mutacją I506V i jedna próbka z mutacją D110H). Trzy metody ekstrakcji DNA zastosowało niezależnie w badaniu dwóch różnych operatorów, którzy wykonali po trzy przebiegi na każdą z metod ekstrakcji. Każda z ekstrakcji była wykonywana przez operatorów w różnych dniach. Stężenie DNA oraz stosunek absorbancji A260/A280 w próbkach gDNA poddanych ekstrakcji określono za pomocą spektrofotometru. Łączny rozmiar próbki w każdej metodzie ekstrakcji w tym badaniu wynosił 168 (14 próbek × 2 operatorów/metodę ekstrakcji × 3 przebiegi/operatora × 2 powtórzenia/próbkę gDNA poddaną ekstrakcji).

Metoda ekstrakcji	Liczba przebadanych próbek	Wskaźnik rozpoznań	Dokładność	Odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu*
Strącanie alkoholem	168	100%	100%	100%
Izolacja w kolumnie z filtrem krzemionkowym	168	100%	100%	100%
Ekstrakcja przy pomocy kulek magnetycznych	168	100%	100%	100%

\* Odsetek próbek ze wskaźnikiem rozpoznań w pierwszym przebiegu na poziomie ≥ 99%.

## Poziomy wejściowe DNA

Zakres poziomów wejściowych DNA dla testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy został oceniony przez wykonanie serii rozcieńczeń przy użyciu 14 reprezentatywnych próbek DNA zawierających 16 unikalnych wariantów CF. Każda z próbek została podwójnie przebadana przy dziewięciu poziomach wejściowych DNA w zakresie 1250-1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng i 1 ng). W celu ustalenia dokładności porównano genotypy próbek z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania dwukierunkowego metodą Sangera, a delecje porównano z wynikami testu PCR. Dla poziomów wejściowych DNA

ustalono górną i dolną granicę odpowiednio na poziomie 1250 ng i 25 ng, ponieważ odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu, wyniósł  $\geq 95\%$ , bez nieprawidłowych rozpoznań (dokładność i wskaźnik rozpoznań na poziomie 100%).

Poziomy wejściowy DNA o wartościach 1250 ng, 250 ng i 100 ng zostały dodatkowo przebadane przy użyciu czterech reprezentatywnych próbek DNA oraz co najmniej 20 powtórzeń na poziom wejściowy DNA poszczególnych próbek ( $n = 4 \times 20 = 80$  próbek), natomiast dolna granica 25 ng została przebadana przy użyciu 14 próbek po 20 powtórzeń dla każdej próbki ( $n = 14 \times 20 = 280$  próbek). Dokładność oraz odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu, wyniosły 100% dla wszystkich poziomów wejściowych DNA.

Wyniki analizy wskazują, że, aby uzyskiwać dokładne odczyty, testu Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy można używać w zakresie poziomów wejściowych DNA od 1250 ng do 25 ng.

## Substancje zakłócające

Aby ocenić wpływ substancji zakłócających na test Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy, przeanalizowano wyniki testu przy obecności i braku potencjalnych substancji zakłócających. W badaniu przetestowano osiem próbek krwi pełnej w tym trzy próbki z niepowtarzalnymi genotypami, dla których uzyskano dodatni wynik badania w kierunku mukowiscydozy. Przebadano cztery endogenne substancje zakłócające (bilirubinę, cholesterol, hemoglobinę oraz trójglicerydy), dodając je do próbek krwi przed ekstrakcją DNA. Limity stężeń poszczególnych substancji przedstawiono w poniższej tabeli. Dodatkowo, w celu oceny zakłóceń wynikających z pobierania krwi (w wyniku krótkich pobrań), z próbkami krwi zmieszano EDTA, natomiast w celu oceny zakłóceń wynikających z przygotowania próbki do oczyszczonego DNA genomowego dodano końcowy bufor płuczający uzyskany metodą izolacji w kolumnie z filtrem krzemionkowym.

W teście Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy dla wszystkich próbek uzyskano 100% poziom rozpoznań nukleotydów, a także 100% odtwarzalność rozpoznań genotypu w obecności oraz przy braku substancji zakłócających.

W celu oceny wpływu zakłócenia powodowanego przez multipleksowanie startera do indeksowania przeprowadzono badania zanieczyszczenia krzyżowego z użyciem dwóch próbek, z których każda charakteryzowała się niepowtarzalnym genotypem homozygotycznym w czterech różnych pozycjach genomowych, oraz dwóch odpowiednich starterów do indeksowania. Nie stwierdzono zmiany pod względem rozpoznawania wariantów przy poziomach zanieczyszczenia  $< 40\%$ . Przy poziomach zanieczyszczenia  $\geq 40\%$  genotyp próbki stał się heterozygotyczny.

Nie zaobserwowano zakłóceń powodowanych przez którąkolwiek z endogennych lub egzogennych substancji zakłócających.

Substancja testowana	Łączna liczba powtórzeń	Przebadane stężenie we krwi (górną granicą)	Przebadane stężenie we krwi (dolną granicą)	Wskaźnik rozpoznań
Bilirubina	16	684 $\mu\text{mol/l}$	137 $\mu\text{mol/l}$	100%
Cholesterol	16	13 $\text{mmol/l}$	2,6 $\text{mmol/l}$	100%
Hemoglobina	16	2 $\text{g/l}$	0,4 $\text{g/l}$	100%
Trójglicerydy	16	37 $\text{mmol/l}$	7,4 $\text{mmol/l}$	100%
EDTA	16	7,0 $\text{mg/ml}$	2,8 $\text{mg/ml}$	100%

## Indeksowanie próbek

Zastosowane w teście startery indeksujące próbek służą do przypisywania unikalnych kodów kreskowych do poszczególnych próbek DNA, co umożliwia tworzenie pul wielu próbek dla pojedynczego przebiegu sekwencjonowania. Przebadano łącznie 96 indeksów próbek przy użyciu ośmiu próbek DNA w celu weryfikacji stałej zdolności testu do rozpoznawania genotypu w określonej próbce z zastosowaniem różnych kombinacji starterów indeksujących. Każda z próbek została przebadana przy użyciu 12 różnych kombinacji starterów indeksujących.

Wyniki dla próbek porównano z danymi sekwencjonowania dwukierunkowego metodą Sangera w odniesieniu do wszystkich pozycji/wariantów za wyjątkiem dwóch dużych delecji, które potwierdzono za pomocą testu PCR typu dupleks. Odtwarzalność i dokładność dla wszystkich kombinacji próbek i starterów indeksujących wyniosły 100%.

## Równoważność działania z testem Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genotypu mukowiscydozy

W przypadku testu TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy (TruSight CF139) stosowania jest ta sama procedura przygotowania biblioteki i te same odczynniki, co w przypadku testu Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay do oznaczania genu mukowiscydozy (MiSeqDx CF139). W teście TruSight CF139 stosowany jest zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3, natomiast w teście MiSeqDx CF139 - odczynniki dołączone do testu. Aby wykazać równoważność pomiędzy testami TruSight CF139 i MiSeqDx CF139, porównano wyniki z dziewięciu przebiegów TruSight CF139 z jednym przebiegiem MiSeqDx CF139 w charakterze wzorca. Przebiegi TruSight CF139 przeprowadzono przy przepustowości 96 próbek (maksymalnej przepustowości tego testu), a przebieg MiSeqDx CF139 przy przepustowości 48 próbek (maksymalnej przepustowości tego testu). Źródła zmienności w przebiegach TruSight CF139 obejmowały trzy zdarzenia związane z przygotowaniem biblioteki (każde z niepowtarzalną serią testów TruSight Cystic Fibrosis do oznaczania genotypu mukowiscydozy), trzech operatorów, trzy aparaty MiSeqDx oraz trzy serie zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3.

Rozpoznanie wariantów w przebiegach TruSight CF139 porównano z rozpoznaniem występującymi w przebiegu MiSeqDx CF139. Każdy przebieg TruSight CF139 obejmował 47 niepowtarzalnych próbek, przy 2-3 powtórzeniach na próbkę (95 próbek DNA i 1 próbkę NTC na przebieg). W przypadku przebiegu MiSeqDx CF139 przeprowadzono sekwencjonowanie tych samych 47 próbek jako singleton (47 próbek DNA + 1 próbka NTC na przebieg). Panel próbek składał się z próbek Coriell DNA uzyskanych z unieśmiertnionych linii komórkowych i obejmował próbki reprezentujące każdy allel mutacji ACMG 23, warianty deleccyjno-insercyjne (w tym insercje/delecje w regionach homopolimerycznych oraz przypadki insercji z delecją w tym samym regionie), warianty homozygotyczne, złożone warianty heterozygotyczne, jedną z dużych, ukierunkowanych delecji, powszechnie występujący wariant PolyTG/PolyT, liczne warianty pojedynczego nukleotydu oraz próbkę bez wykrytych wariantów. Podsumowanie wyników według genotypu zawiera [Tabela 19](#). Zgodność pomiędzy testami według typu wariantu zawiera [Tabela 20](#). Ogólna (całkowita) zgodność pomiędzy testami wyniosła > 99,99%.

Tabela 19 Porównanie testów TruSight i MiSeqDx do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy pod względem skuteczności rozpoznawania wariantów

		Test MiSeqDx CF 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy				Łącznie
		Wariant HOM	Wariant HET	Typ dziki	Brak rozpoznania	
Test TruSight CF 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy	Wariant HOM	87	-	-	-	87
	Wariant HET	-	1098	-	-	1098
	Typ dziki	-	-	113 889	-	113 889
	Brak rozpoznania	-	-	-	-	-
	Łącznie	87	1098	113 889	-	115 074

Tabela 20 Porównanie wyników według typu wariantu pomiędzy testami TruSight i MiSeqDx do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy

Typ wariantu	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznania	Zgodność z testem MiSeqDx do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy
SNV	672	0	0	100,00% (672/672)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	495	0	0	100,00% (495/495)

Typ wariantu	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Zgodność z testem MiSeqDx do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44% (17/18)
Brak (typ dziki)	113 889	0	0	100,00% (113 889/113 889)
Łącznie	115 091	1	0	> 99,99% (115 091/115 092)

Stwierdzono jedną niezgodność rozpoznania pomiędzy testami TruSight CF139 i MiSeqDx CF139. Nieprawidłowe rozpoznanie dotyczyło wariantu PolyTG/PolyT. Opis zgodności w zakresie rozpoznania wariantu PolyTG/PolyT zawiera [Tabela 21](#). Ponieważ genotyp PolyTG/PolyT jest zgłaszany tylko, jeśli zostanie wykryty również wariant R117H, zbiór danych obejmuje wyłącznie rozpoznania PolyTG/PolyT z pojedynczego źródła DNA.

Tabela 21 Porównanie wyników testów TruSight i MiSeqDx do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy pod względem rozpoznawania wariantów PolyTG/PolyT

	Test MiSeqDx CF 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy			
	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	Brak rozpoznania	Łącznie
Test TruSight CF 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy	(TG)12(T)5 / (TG)10(T)9	17	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12(T)5	1	-	1
	Brak rozpoznania	-	-	-
	Łącznie	18	-	18

## Charakterystyka działania testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Parametry użytkowe testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy podano na podstawie badań, w których zastosowano test MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy. Równoważność pomiędzy testami TruSight i MiSeqDx opisano w części [Równoważność działania z testem Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy na stronie 95](#).

### Dokładność

Dokładność testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy oceniono na podstawie analizy 500 próbek zawierających szeroki zakres wariantów CFTR pochodzących z czterech różnych źródeł. Podstawowym źródłem danych do oceny dokładności było badanie dokładności klinicznej przeprowadzone z zastosowaniem panelu obejmującego 366 próbek. Większość próbek (n = 355) składała się ze zarchiwizowanego, zamrożonego materiału klinicznego gDNA, wyizolowanego z ludzkiej krwi. Pozostałe 11 próbek uzyskano z ogólnodostępnego materiału pochodzącego z linii komórkowych.

Dane z tego badania uzupełniono danymi na temat dokładności pochodzącymi z 68 próbek z linii komórkowych, które oceniono w badaniu odtwarzalności, 14 próbek klinicznych z badania analitycznego oceny metody ekstrakcji oraz 52 próbek syntetycznych plazmidów. Syntetyczne plazmidy zaprojektowano w taki sposób, aby zawierały kontekst genomowy rzadkich wariantów. W jednej konstrukcji zawierały one od 1 do 10 wariantów. Poddano je linearyzacji, rozcieńczono w celu uzyskania liczby kopii odpowiadającej DNA genomowemu i zmieszano z próbkami ludzkiego DNA genomowego typu dzikiego przy równoważnej liczbie kopii, aby imitować próbkę heterozygotyczną.

W przypadku testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy porównano łącznie 5206 pozycji z metodami referencyjnymi, którymi były sekwencjonowanie dwukierunkowe metodą Sangera i test PCR. Wyniki genotypowania dla lokalizacji SNV i małych polimorfizmów typu indel, w tym regionu PolyTG/PolyT, porównano z analizą sekwencjonowania dwukierunkowego metodą Sangera.

Jako metodę referencyjną dla dwóch dużych delecji w panelu zastosowano dwa zwalidowane testy oparte na metodzie PCR. W każdym z testów PCR typu dupleks zastosowano dwa zestawy starterów w celu rozróżnienia pomiędzy genotypem typu dzikiego, heterozygotycznym i homozygotycznym. Jeden z zestawów starterów został zaprojektowany w taki sposób, aby otaczał punkty złamań delecji, natomiast drugi wzmacniał region objęty delecją. Dwa produkty wykrywano poprzez rozdział wg rozmiaru w żelu agarozowym. Testy PCR zwalidowano za pomocą panelu z łącznie 28 próbkami (22 próbki dla każdej delecji) składającego się z próbek DNA genomowego pochodzącego z linii komórkowych i krwi oraz syntetycznych plazmidów obejmujących genotypy WT, HET i HOM dla każdej dużej delecji. Oceniając produkty PCR na żelu agarozowym, potwierdzono 100% swoistość i odtwarzalność testów PCR dla wszystkich badanych próbek. Dokładność testów PCR potwierdzono za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Wyniosła ona 100% dla wszystkich próbek.

Za pomocą trzech miar statystycznych określono dokładność dla każdego genotypu. Zgodność dodatnią (PA) obliczono dla genotypu każdego wariantu, dzieląc liczbę próbek ze zgodnym rozpoznaniem wariantu przez całkowitą liczbę próbek z tym wariantem zgodnie z identyfikacją za pomocą metod referencyjnych. Zgodność ujemną (NA) obliczono we wszystkich pozycjach typu dzikiego (WT), dzieląc liczbę zgodnych pozycji WT przez całkowitą liczbę pozycji WT zgodnie z metodami referencyjnymi. Zgodność ogólną (OA) obliczono we wszystkich zaraportowanych pozycjach, dzieląc liczbę zgodnych WT i pozycji wariantów przez całkowitą liczbę zaraportowanych pozycji zgodnie z ustaleniami za pomocą metod referencyjnych.

Test Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy charakteryzował się wartością PA na poziomie genotypu wynoszącą 99,66%, z uwzględnieniem wariantów PolyTG/PolyT (100% z wyłączeniem wariantów PolyTG/PolyT). Wartość NA dla wszystkich pozycji WT wynosiła > 99,99%; wartość OA dla wszystkich zaraportowanych pozycji również wynosiła > 99,99%.

Tabela 22 Ogólna dokładność testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Ekson 1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Ekson 1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Ekson 1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2,3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron 1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Ekson 2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Ekson 2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Ekson 3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Ekson 3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Ekson 3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Ekson 3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Ekson 3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Ekson 3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Ekson 3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Ekson 3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron 3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Ekson 4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Ekson 4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Ekson 4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Ekson 4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Ekson 4	0	2	0	0	0	100



Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Ekson 4	0	0	1	0	0	100
D110H	c.328G>C	SNV	Ekson 4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Ekson 4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Ekson 4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Ekson 4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Ekson 4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Ekson 4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Ekson 4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron 4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron 4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Ekson 5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Ekson 5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron 5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron 5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron 5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Ekson 6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Ekson 6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Ekson 6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Ekson 6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Ekson 6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Ekson 6	0	0	1	0	0	100
L227R	c.680T>G	SNV	Ekson 6	0	0	1	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Ekson 6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Ekson 7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Ekson 8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Ekson 8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Ekson 8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Ekson 8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Ekson 8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Ekson 8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Ekson 8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Ekson 8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Ekson 8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Ekson 8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Ekson 8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Ekson 8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Ekson 8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Ekson 8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron 8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Ekson 9	0	0	2	0	0	100
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Ekson 9	0	0	1	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Ekson 9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron 9	0	0	2	0	0	100
PolyTGPolyT	nd.	PolyTG PolyT	Intron 9	369	79	52	3	4 <sup>#</sup>	98,60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Ekson 10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Ekson 10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Ekson 11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Ekson 11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Ekson 11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Ekson 11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Ekson 11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Ekson 11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Ekson 11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Ekson 11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Ekson 11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Ekson 11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Ekson 11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Ekson 11	7	0	0	0	0	100
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Ekson 11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Ekson 11	84	29	0	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
I507V	c.1519A>G	SNV	Ekson 11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Ekson 11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Ekson 11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Ekson 11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Ekson 11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Ekson 11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Ekson 11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron 11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Ekson 12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Ekson 12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Ekson 12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Ekson 12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Ekson 12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Ekson 12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Ekson 12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Ekson 12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Ekson 12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Ekson 12	0	0	1	0	0	100
A559T	c.1675G>A	SNV	Ekson 12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Ekson 12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Ekson 12	6	1	0	0	0	100
1811+1,6kb A>G	c.1679+1,6kb A>G	SNV	Intron 12	0	0	1	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznai*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Ekson 13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Ekson 13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Ekson 13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Ekson 13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Ekson 13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Ekson 13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Ekson 13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Ekson 13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron 13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron 13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Ekson 14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Ekson 14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Ekson 14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Ekson 14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Ekson 14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Ekson 14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Ekson 14	3	1	0	0	0	100
2184delA	c.2052delA	DIV	Ekson 14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Ekson 14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Ekson 14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Ekson 14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Ekson 14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Ekson 14	2	0	0	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznania dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Ekson 14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Ekson 14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Ekson 14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Ekson 14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Ekson 14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Ekson 14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Ekson 14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Ekson 14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron 14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Ekson 15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Ekson 15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Ekson 15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Ekson 15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Ekson 15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Ekson 15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Ekson 15	2	0	0	0	0	100
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron 16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron 16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Ekson 17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Ekson 17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Ekson 17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Ekson 17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Ekson 17	1	0	0	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
3007delG	c.2875delG	DIV	Ekson 17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Ekson 17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Ekson 17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Ekson 18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Ekson 18	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	Ekson 19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Ekson 19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Ekson 19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron 19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Ekson 20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Ekson 20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Ekson 20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Ekson 20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Ekson 20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Ekson 20	0	2	0	0	0	100
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Ekson 20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Ekson 20	0	0	1	0	0 <sup>¥</sup>	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Ekson 20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Ekson 20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Ekson 20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Ekson 20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Ekson 20	2	2	0	0	0	100

Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
E1104X	c.3310G>T	SNV	Ekson 20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron 20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Ekson 21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Ekson 21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Ekson 22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Ekson 22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Ekson 22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Ekson 22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Ekson 22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Ekson 22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Ekson 22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Ekson 22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Ekson 22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Ekson 22	9	1	0	0	0	100
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron 22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Ekson 23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Ekson 23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Ekson 23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Ekson 23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Ekson 23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Ekson 23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Ekson 23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron 23	0	0	1	0	0	100



Genotyp (nazwa pospolita / nazwa cDNA / współrzędna)	Nazwa cDNA	Typ wariantu	Region genu CFTR (hg19)	Rozpoznanie dodatnie (warianty)			Brak rozpoznań*	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	Zgodność dodatnia
				Próbki kliniczne	Próbki z linii komórkowych	Próbki syntetyczne			
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Ekson 24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Ekson 24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Ekson 24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Ekson 24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Ekson 25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Ekson 25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron 24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Ekson 27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Ekson 27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Ekson 27	150	32	0	0	0	100
Łącznie wszystkie warianty (PA)†						2072	3	4	99,66
Łącznie wszystkie typu dzikiego (zgodność ujemna)						2600928	1	2 <sup>§</sup>	> 99,99
Łącznie wszystkie typu dzikiego i warianty (zgodność całkowita)						2603000	4	6	> 99,99

DIV oznacza wariant delecja/insercja.

\* Próbek nie testowano ponownie.

^ Oprogramowanie nie raportuje nazwy cDNA w przypadku tej współrzędnej genomowej.

\* W raporcie z sekwencjonowania metodą Sangera wariant P205S wymieniono jako heterozygotyczny w odniesieniu do próbki klinicznej. Natomiast analiza danych zebranych metodą Sangera wskazuje, że wariant był w rzeczywistości homozygotyczny i zaraportowany nieprawidłowo. Aparat MiSeqDx zaraportował ten wariant jako homozygotyczny.

# Jeden z niezgodnych wyników pochodził z badania odtwarzalności. Wynik dotyczący PolyTG/PolyT w odniesieniu do próbki był zgodny we wszystkich 18 odtworzeniach, ale niezgodny z sekwencjonowaniem dwukierunkowym metodą Sangera.

\* Pierwotna syntetyczna próbka heterozygotyczna została uznana za przygotowaną nieprawidłowo. Gdy ją następnie zbadano po ponownym przygotowaniu i zastosowaniu tego samego plazmidu - została wykryta.

† Wartość PA z wyłączeniem rozpoznań PolyTG/PolyT wyniosła 100%.

§ Próbką syntetyczną, heterozygotyczną w odniesieniu do eksonu 8, została zaraportowana jako heterozygotyczna w odniesieniu do wariantu CFTR dele22,23. Dalsza analiza wykazała, że ten wynik był prawdopodobnie skutkiem zanieczyszczenia o niskim poziomie. Dodatkowo, w przypadku drugiej próbki, startery zastosowane w metodzie Sangera nie mogły w pełni wykryć wariantu Q1463Q ze względu na polimorfizmy typu indel zarówno przed, jak i za lokalizacją wariantu.

Tabela 23 Dokładność oceny wariantu PolyTG/PolyT w teście Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Genotyp PolyTG/PolyT	Liczba próbek klinicznych	Liczba próbek z linii komórkowych	Liczba próbek syntetycznych	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów*	Dokładność [%]
(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
(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

Genotyp PolyTG/PolyT	Liczba próbek klinicznych	Liczba próbek z linii komórkowych	Liczba próbek syntetycznych	Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów*	Dokładność [%]
(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>Łącznie</b>		<b>448</b>		<b>4</b>	<b>3</b>	<b>98,44</b>

\* Próbek nie testowano ponownie.

^ Jeden z niezgodnych wyników pochodził z badania odtwarzalności. Wynik dotyczący PolyTG/PolyT w odniesieniu do próbki był zgodny we wszystkich 18 odtworzeniach, ale niezgodny z sekwencjonowaniem dwukierunkowym metodą Sangera.

## Odtwarzalność

Odtwarzalność testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy określono na podstawie badania z zastosowaniem ślepej próby przeprowadzonego na 3 stanowiskach. Każde stanowisko obsługiwało 2 operatorów. Każdy z operatorów na każdym stanowisku przebadał dwa dobrze scharakteryzowane panele po 46 próbek, co dało łącznie 276 wyników próbek na operatora. Panel zawierał mieszaninę genomowego DNA z limfoblastowych linii komórkowych ze znanymi mutacjami w genie *CFTR*, a także krew o obniżonej zawartości leukocytów zmieszaną z limfoblastowymi liniami komórkowymi ze znanymi mutacjami w genie *CFTR*. Próbkę krwi dostarczono w celu przeprowadzenia czynności ekstrakcji do przygotowania gDNA będącego materiałem wejściowym w procedurze oznaczenia.

Odsetek prawidłowych próbek, określany jako liczba próbek spełniających wymagania parametrów kontroli jakości w pierwszej próbie, wyniósł 99,7%. Wszystkie wyniki dotyczą pierwszego badania.

Zgodność dodatnia na poziomie genotypu dla wszystkich wariantów, w tym wariantu PolyTG/PolyT, wyniosła 99,22%, natomiast przy wykluczeniu wariantu PolyTG/PolyT wyniosła 99,60%. Zgodność ujemna dla wszystkich WT wyniosła 99,70%, tak samo jak zgodność ogólna dla wszystkich zaraportowanych pozycji. Zgodność dodatnia w przypadku wariantu PolyTG/PolyT wyniosła 97,83%.

Tabela 24 Odtwarzalność testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy (z wyłączeniem wariantów PolyTG/PolyT)

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań €	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznajeń	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznania	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznajeń	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań €	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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



Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań €	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań €	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznania	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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.2012delIT	2143delIT	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
54, 91	c.262_263delITT	394delITT	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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznaię	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznaię	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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

Próbka	Nazwa HGVS (lub lokalizacja w razie braku HGVS)	Nazwa wariantu	Suma wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie* (wszystkie stanowiska)		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań <sup>ε</sup>	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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
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
Łącznie wszystkie warianty (zgodność dodatnia)** (w tym dane dot. PolyTG/PolyT w Tabeli 25)			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
Łącznie wszystkie typu dzikiego (zgodność ujemna)			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
Łącznie wszystkie typu dzikiego i warianty (zgodność całkowita)			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

<sup>ε</sup> Próbek nie testowano ponownie.

<sup>^</sup> Przy jednym powtórzeniu każdej z próbek 5 i 75 wskaźnik rozpoznań wyniósł 0%. Dalsza analiza wykazała, że próbki prawdopodobnie nie zostały wprowadzone do płytki na próbkę przed przygotowaniem biblioteki.

\* Weryfikacja wykazała, że próbki 9 i 10 zostały prawdopodobnie zamienione przez operatora przed przygotowaniem biblioteki.

\*\* Z wyłączeniem wariantów PolyTG/PolyT zgodność dodatnia wynosiła 99,60%.

Tabela 25 Odtwarzalność PolyTG/PolyT dla testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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%
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%



Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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%
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%

Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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%
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%

Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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%
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%

Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
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%
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%

Panel	Próbka	Genotyp	Liczba wyników		Zgodne rozpoznania			Łącznie wszystkie stanowiska		Odsetek zgodności
			Na każde stanowisko	Wszystkie stanowiska	Stanowisko 1	Stanowisko 2	Stanowisko 3	Brak rozpoznań	Nieprawidłowo rozpoznane nukleotydy	
B	84	(TG)10(T)7/ (TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
Łączna liczba wariantów PolyTG/PolyT (zgodność dodatnia)			552	1656	537	540	543	17	19	97,83%

\* Każda z 18 próbek była zgodna z pozostałymi, ale niezgodna z sekwencjonowaniem dwukierunkowym metodą Sangera.

## Ekstrakcja DNA

Wykorzystując preparat krwi pełnej z antykoagulantem K<sub>2</sub>EDTA, przeprowadzono ocenę, stosując trzy powszechnie stosowane, ogólnodostępne metody ekstrakcji: przy pomocy kulek magnetycznych, strącania alkoholem oraz izolacji przy użyciu kolumny z filtrem krzemionkowym. W ciągu badania wykorzystano łącznie 14 próbek krwi. W dwóch genotyp był typu dzikiego, natomiast pozostałe reprezentowały niepowtarzalne genotypy obejmujące dziewięć różnych wariantów, w tym zarówno warianty pospolite, jak i rzadkie. W przypadku wariantu PolyTG/PolyT włączano do analizy próbki z (T)5-9 i (TG)10-12. Trzy metody ekstrakcji DNA zastosowało niezależnie w badaniu dwóch różnych operatorów, którzy wykonali po trzy przebiegi na każdą z metod ekstrakcji. Każda z ekstrakcji była wykonywana przez operatorów w różnych dniach. Stężenie DNA oraz stosunek absorbancji A260/A280 w próbkach gDNA poddanych ekstrakcji określono za pomocą spektrofotometru. Łączny rozmiar próbki w każdej metodzie ekstrakcji w tym badaniu wynosił 168 (14 próbek × 2 operatorów/metodę ekstrakcji × 3 przebiegi/operatora × 2 powtórzenia/próbkę gDNA poddaną ekstrakcji).

Metoda ekstrakcji	Liczba przebadanych próbek	Wskaźnik rozpoznań	Dokładność	Odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu*
Strącanie alkoholem	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Izolacja w kolumnie z filtrem krzemionkowym	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Ekstrakcja przy pomocy kulek magnetycznych	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

\* Odsetek próbek ze wskaźnikiem rozpoznań w pierwszym przebiegu na poziomie > 99%.

## Poziomy wejściowe DNA

Zakres poziomów wejściowych DNA dla testu Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy został oceniony przez wykonanie serii rozcieńczeń przy użyciu 14 reprezentatywnych próbek DNA zawierających 16 unikalnych wariantów CF. Każda z próbek została podwójnie przebadana przy 9 poziomach wejściowych DNA od 1250 ng do 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng i 1 ng). W celu ustalenia dokładności porównano genotypy próbek z danymi uzyskanymi za pomocą sekwencjonowania dwukierunkowego metodą Sanger, a delecje porównano z wynikami testu PCR. Dla poziomów wejściowych DNA ustalono górną i dolną granicę odpowiednio na poziomie 1250 ng i 25 ng, ponieważ odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu, wyniósł ≥ 95%, bez nieprawidłowych rozpoznań (dokładność i wskaźnik rozpoznań na poziomie 100%).

Poziomy wejściowe DNA o wartościach 1250 ng, 250 ng i 100 ng zostały dodatkowo przebadane przy użyciu 4 reprezentatywnych próbek DNA oraz co najmniej 20 powtórzeń na poziom wejściowy DNA poszczególnych próbek (n = 4 × 20 = 80 próbek), natomiast dolna granica 25 ng została przebadana przy użyciu 14 próbek po 20 powtórzeń dla każdej próbki (n = 14 × 20 = 280 próbek). Dokładność oraz odsetek próbek, w których nukleotydy zostały rozpoznane w pierwszym przebiegu, wyniosły 100% dla wszystkich poziomów wejściowych DNA.

## Substancje zakłócające

Aby ocenić wpływ substancji zakłócających na system Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis System do oznaczania genu mukowiscydozy, przeanalizowano wyniki testu przy obecności i braku potencjalnych substancji zakłócających. W badaniu przetestowano szesnaście próbek krwi pełnej z niepowtarzalnymi genotypami mukowiscydozy. Przebadano cztery endogenne substancje zakłócające (bilirubinę, cholesterol, hemoglobinę oraz trójglicerydy), dodając je do próbek krwi przed ekstrakcją DNA. Limity stężeń poszczególnych substancji przedstawiono w poniższej tabeli. Dodatkowo, w celu oceny zakłóceń wynikających z pobierania krwi (w wyniku krótkich pobrań), z próbkami krwi zmieszano EDTA, natomiast w celu oceny zakłóceń wynikających z przygotowania próbki do oczyszczonego DNA genomowego dodano końcowy bufor płuczący uzyskany metodą izolacji w kolumnie z filtrem krzemionkowym.

W teście Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy uzyskano dla wszystkich próbek 100% poziom rozpoznań nukleotydów, a także 100% odtwarzalność rozpoznań genotypu w obecności oraz przy braku substancji zakłócających. Nie zaobserwowano zakłóceń powodowanych przez którąkolwiek z endogennych lub egzogennych substancji zakłócających.

W celu oceny wpływu zakłócenia powodowanego przez multipleksowanie startera do indeksowania przeprowadzono badania zanieczyszczenia krzyżowego z użyciem dwóch próbek, z których każda charakteryzowała się niepowtarzalnym genotypem homozygotycznym w czterech różnych pozycjach genomowych, oraz dwóch odpowiednich starterów do indeksowania. Nie stwierdzono zmiany pod względem rozpoznawania wariantów przy poziomach zanieczyszczenia < 40%. Przy poziomach zanieczyszczenia  $\geq$  40% genotyp próbki stał się heterozygotyczny.

Substancja testowana	Łączna liczba powtórzeń	Przebadane stężenie we krwi (górną granicą)	Przebadane stężenie we krwi (dolną granicą)	Wskaźnik rozpoznań
Bilirubina	16	684 $\mu$ mol/l	137 $\mu$ mol/l	100%
Cholesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Hemoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trójglicerydy	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

## Równoważność działania z testem Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

W teście TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy (TruSight CFCS) wykorzystywana jest ta sama procedura przygotowania biblioteki i te same odczynniki, co w teście Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay do oznaczania genu mukowiscydozy (MiSeqDx CFCS). W teście TruSight CFCS stosowany jest zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3, natomiast w teście MiSeqDx CFCS - odczynniki dołączone do testu. Aby wykazać równoważność pomiędzy testami TruSight CFCS i MiSeqDx CFCS, porównano wyniki z dziewięciu przebiegów TruSight CFCS z jednym przebiegiem MiSeqDx CFCS w charakterze wzorca. Przebiegi TruSight CFCS przeprowadzono przy przepustowości 96 próbek (maksymalnej przepustowości tego testu), a przebieg MiSeqDx CFCS przy przepustowości 48 próbek (maksymalnej przepustowości tego testu). Źródła zmienności w przebiegach TruSight CFCS obejmowały trzy zdarzenia związane z przygotowaniem biblioteki (każde z niepowtarzalną serią testów TruSight Cystic Fibrosis do oznaczania genu mukowiscydozy), trzech operatorów, trzy aparaty MiSeqDx oraz trzy serie zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3.

Rozpoznania wariantów w przebiegach TruSight CFCS porównano z rozpoznaniem występującymi w przebiegu MiSeqDx CFCS. Każdy przebieg TruSight CFCS obejmował 47 niepowtarzalnych próbek, przy 2-3 powtórzeniach na próbkę (95 próbek DNA i 1 próbkę NTC na przebieg). W przypadku przebiegu MiSeqDx CFCS przeprowadzono sekwencjonowanie tych samych 47 próbek jako singleton (47 próbek DNA + 1 próbka NTC na przebieg). Panel próbek składał się z próbek Coriell DNA uzyskanych z unieśmiertnionych linii komórkowych i obejmował próbki reprezentujące każdy allel mutacji ACMG 23, warianty delecyjno-insercyjne (w tym insercje/delecje w regionach homopolimerycznych oraz przypadki insercji z delecją w tym samym regionie), warianty homozygotyczne, złożone warianty heterozygotyczne, jedną z dużych, ukierunkowanych delecji, warianty PolyTG/PolyT, warianty pojedynczego nukleotydu oraz próbkę bez wykrytych wariantów. Podsumowanie wyników według genotypu zawiera [Tabela 26](#). Zgodność pomiędzy testami według typu wariantu zawiera [Tabela 27](#). Ogólna (całkowita) zgodność pomiędzy testami wyniosła > 99,99%.

Tabela 26 Porównanie testów TruSight CFCS-Variant Assay i MiSeqDx CFCS-Variant Assay do oznaczania wariantów genu mukowiscydozy pod względem skuteczności rozpoznawania wariantów

	Test MiSeqDx CF Clinical Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy				
	Wariant HOM	Wariant HET	Typ dziki	Brak rozpoznania	Łącznie
Test TruSight CF Clinical Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy	Wariant HOM	551	-	-	551
	Wariant HET	-	2664	-	2664
	Typ dziki	-	-	4 426 182	4 426 182
	Brak rozpoznania	-	-	58	58
	Łącznie	551	2664	4 426 420	-

Tabela 27 Porównanie skuteczności oznaczania wariantów (według typu wariantu) przez testy do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy TruSight CF Clinical Sequencing Assay oraz MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay

Typ wariantu	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Zgodność z testem MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay
SNV	2684	0	0	100,00% (2684/2684)
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)
Brak (typ dziki)	4 426 182	0	58	100,00% (4 426 182/4 426 240)
Łącznie	4 430 244	1	61	> 99,99% (4 430 244/4 430 306)



Stwierdzono jedną niezgodność rozpoznania pomiędzy testami TruSight CFCS i MiSeqDx CFCS. Nieprawidłowe rozpoznanie dotyczyło wariantu PolyTG/PolyT. Opis zgodności w zakresie wariantów PolyTG/PolyT zawiera [Tabela 28 na stronie 97](#).

Tabela 28 Wyniki testu TruSight CF Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy w zakresie rozpoznawania wariantów PolyTG/PolyT w porównaniu z testem MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy

		Tabela dot. testu MiSeqDx CF Clinical Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy												
		(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	Brak rozpoznania	Łącznie
Test TruSight CF Clinical Assay do sekwencjonowania klinicznego genu mukowiscydozy	(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
	Brak rozpoznania	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
	Łącznie	50	189	18	18	72	18	126	252	72	36	-	-	851

## Bibliografia

- 1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K i wsp. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6(5): 387-391.
- 2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1-4.
- 3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations- Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575-606.
- 4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL i wsp. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851-868.
- 5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, red. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Dostęp pod adresem [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250). [Online] Aktualizacja 19.02.2008 r.
- 6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Dostęp pod adresem [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). [Online] 07.12.2012 r.
- 7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C i wsp. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4-S14.
- 8 Rejestr fundacji na rzecz pacjentów z mukowiscydozą: raport roczny z 2010 r.
- 9 Baza danych nt. mutacji genu mukowiscydozy (CFTR1). Dostęp pod adresem [www.genet.sickkids.on.ca/app](http://www.genet.sickkids.on.ca/app). [Online] Sierpień 2013 r.
- 10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L i wsp. (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). Dostęp pod adresem [www.cftr2.org](http://www.cftr2.org). [Online] Sierpień 2013 r.
- 12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Dostęp pod adresem [www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf](http://www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf). [Online] Prezentował Garry Cutting w imieniu Inicjatywy CFTR2 podczas 25. corocznej konferencji na temat mukowiscydozy w Ameryce Północnej (ang. North American Cystic Fibrosis Conference, NACFC) sponsorowanej przez Fundację ds. Mukowiscydozy (ang. Cystic Fibrosis Foundation). 04.11.2011 r. Anaheim, CA.
- 13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H i wsp. (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. (marzec/kwiecień 2001 r.) 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 i wsp. (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 i wsp. (maj 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 i wsp. (wyd. 2008, zmienione 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 i wsp. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733-747.

## Historia wersji

Dokument	Data	Opis zmiany
Nr dokumentu: 1000000097720 wer. 03	Maj 2022 r.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zaktualizowano treść całego dokumentu z uwzględnieniem zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (nr kat. 20063860) i procedury wykonywania testów z jego użyciem.</li> <li>Utworzono podpunkt „Przygotowanie próbek” w punkcie „Uwagi dotyczące procedury” i przeniesiono zawarte w nim informacje o ekstrakcji i kwantyfikacji DNA do tego podpunktu.</li> <li>Dodano oświadczenie „Ostrzeżenia i środki ostrożności” dotyczące zgłaszania poważnych incydentów związanych z tym produktem do firmy Illumina oraz właściwego organu państwa członkowskiego.</li> <li>Dodano oświadczenie „Podsumowanie bezpieczeństwa i sposobu działania” z podstawowym kodem UDI-DI do punktu „Oznaczenie produktu”.</li> <li>Skorygowano umiejscowienie ikony <sup>™</sup> w informacjach ogólnych o produkcie.</li> <li>Zaktualizowano ikony uwagi, przestrogi i ostrzeżenia.</li> <li>Uzupełniono tabelę „Historia wersji”.</li> </ul>
Nr dokumentu: 1000000097720 wer. 02	Sierpień 2021 r.	Dodano tabelę z historią wersji. Zaktualizowano adres autoryzowanego przedstawiciela w UE.
Nr dokumentu: 1000000097720 wer. 01	Czerwiec 2020 r.	Dodano nowy numer katalogowy 20037124 dla zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3.
Nr dokumentu: 1000000097720 wer. 00	Marzec 2020 r.	Pierwsze wydanie.

## Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

**NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.**

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2022 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

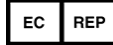
Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć na stronie [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

AMPure, Beckman i Beckman Coulter są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Beckman Coulter, Inc.

## Informacje kontaktowe



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Sponsor australijski

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

## Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w kluczu symboli użytych w danym zestawie, dostępnym na stronie [support.illumina.com](https://support.illumina.com).

Po uruchomieniu europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (Eudamed) charakterystyka bezpieczeństwa i działania (SSP) tego wyrobu będzie dostępna na stronie <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Jest ona powiązana z podstawowym kodem UDI-DI (0081627002CYSTFIB8C).