

## Bijsluiter

VOOR GEBRUIK BIJ IN-VITRODIAGNOSTIEK.

**Catalogusnr. 20036925: 1-4 runs, maximaal 96 monsters per kit**

## Productoverzicht

De TruSight™ Cystic Fibrosis Library Prep is een bibliotheekvoorbereidingskit die de TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en de TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ondersteunt.

## Beoogd gebruik voor de TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

De TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (voorheen bekend als de Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) is een hoogwaardig systeem voor *in-vitro*diagnostiek dat wordt gebruikt om gelijktijdig 139 klinisch relevante cystische fibrose veroorzakende mutaties en varianten van het cystische fibrose transmembraan geleidingsregulator (CFTR)-gen te detecteren in genomisch DNA dat is geïsoleerd uit menselijke perifere volbloedmonsters. De varianten omvatten de varianten die in 2004 werden aanbevolen door het American College of Medical Genetics (ACMG)<sup>1</sup> en in 2011 door het American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).<sup>2</sup> De test is bedoeld voor screening op dragerschap bij volwassenen in de vruchtbare leeftijd, in bevestigende diagnostische testen van pasgeborenen en kinderen, en als een eerste test om te helpen bij de diagnose van personen waarvan wordt vermoed dat ze cystische fibrose hebben. De resultaten van deze test zijn bedoeld om te worden geïnterpreteerd door een gecertificeerd klinisch moleculair geneticus of iemand met gelijkwaardige kwalificaties en moeten worden gebruikt in combinatie met andere beschikbare laboratorium- en klinische gegevens.

Deze test is niet geïndiceerd voor het screenen van pasgeborenen, als diagnostische test van de foetus, pre-implantatietest of voor zelfstandige diagnostische doeleinden.

De test is bedoeld voor gebruik op de Illumina MiSeqDx-instrument.

# Beoogd gebruik voor de TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

De TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (voorheen bekend als de Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay) is een *in-vitro* diagnostisch systeem voor gerichte sequencing dat resequencing uitvoert van de eiwitcoderende gebieden en intron/exon-grenzen van het cystische fibrose transmembraan geleidingsregulator (CFTR)-gen in genomisch DNA dat is geïsoleerd uit menselijke perifere volbloedmonsters verzameld in K<sub>2</sub>EDTA. De test detecteert enkelvoudige nucleotidevarianten en kleine indels binnen de gesequencede regio en rapporteert bovendien over twee diepe intronische mutaties en twee grote deleties. De test is bedoeld voor gebruik op de Illumina MiSeqDx-instrument.

De test is bedoeld als hulpmiddel bij de diagnose van personen waarvan wordt vermoed dat ze cystic fibrose (CF) hebben. Deze assay is het meest geschikt wanneer de patiënt een atypische of niet-klassieke presentatie van CF heeft of wanneer beide oorzakelijke mutaties niet met andere mutatiepanels konden worden vastgesteld. De resultaten van de test zijn bedoeld om te worden geïnterpreteerd door een gecertificeerd klinisch moleculair geneticus of iemand met gelijkwaardige kwalificaties en moeten worden gebruikt in combinatie met andere beschikbare informatie, waaronder klinische symptomen, andere diagnostische tests en familiegeschiedenis.

Deze test is niet geïndiceerd voor gebruik voor zelfstandige diagnostische doeleinden, diagnostische tests van de foetus, pre-implantatietests, dragerschapsscreening, screening van pasgeborenen of bevolkingsonderzoek.

## Achtergrond cystische fibrose

### Klinische beschrijving

Cystic fibrose (CF) is een van de meest voorkomende genetische aandoeningen van de westerse wereld en de meest voorkomende levensbedreigende autosomaal recessieve aandoening bij de niet-Latijns-Amerikaanse blanke bevolking.<sup>3-7</sup> CF beïnvloedt de viscositeit van slijmafscheidingen en beïnvloedt het epitheel van de luchtwegen, de pancreas, de darmen, het hepatobiliaire systeem, de mannelijke geslachtsorganen en de zweetklieren, wat resulteert in complexe multi-orgaan-, multisysteemziekte<sup>4-6</sup> waarbij de longen het primaire orgaansysteem zijn dat met morbiditeit en mortaliteit wordt geassocieerd.<sup>8</sup> In veel gevallen voorspelt een achteruitgang in de voedingsstatus de progressie van CF-longziekte. Een belangrijk aandachtspunt van de huidige interventie-inspanningen is een vroege diagnose door middel van screening van pasgeborenen<sup>7</sup>, waardoor een tijdige toegang tot essentiële medische diensten wordt vergemakkelijkt en de best mogelijke uitkomst wordt geboden voor personen met de ziekte.<sup>4,7</sup> Hoewel er sekseverschillen zijn voor wat betreft de overlevingskansen, waarbij de mediane overlevingsduur groter is voor mannen dan voor vrouwen, is de totale mediane overlevingsduur in de VS 38,3 jaar.<sup>8</sup>

## CFTR-varianten en incidentie

Het in 1989 geïdentificeerde cystische fibrose transmembraan geleidingsregulator (CFTR)-gen bevindt zich op de lange arm van chromosoom 7 en bevat 27 coderende exons verspreid over 230 kb.<sup>4</sup> Een mRNA van 6,5 kb geproduceerd door het normale allel codeert CFTR, een integraal membraaneiwit van 1490 aminozuren dat functioneert als een gereguleerd chloridekanaal in de epitheelcellen van meerdere organen.<sup>4,5</sup> Er zijn momenteel meer dan 1900 varianten van CFTR beschreven, waarvan de meeste puntmutaties zijn.<sup>9</sup> De meest voorkomende CFTR-variant is het F508del-allel<sup>5</sup>, dat bijna 70% van alle CFTR-varianten uitmaakt.<sup>3</sup> Andere veel voorkomende CFTR-varianten resulteren echter vaak in een CF-fenotype en andere CFTR-gerelateerde aandoeningen.<sup>3-5</sup>

Cystische fibrose heeft een ziekte-incidentie die wordt geschat op één op de 2000–4000 geboortes en een prevalentie van ongeveer 30.000 personen binnen de Amerikaanse bevolking.<sup>4</sup> Het komt voor in alle etnische en raciale populaties, met verschillende frequenties: één op de 3000 blanke Amerikanen, één op de 9200 Latijns-Amerikaanse Amerikanen, één op de 10.900 Inheemse Amerikanen, één op de 15.000 Afro-Amerikanen en één op de 31.000 Aziatische Amerikanen.<sup>4,6</sup> De huidige schattingen van de frequentie van dragerschap van CFTR-mutaties naar etniciteit in de VS, gebaseerd op een cohort van 364.890 personen die zijn verwezen voor dragerschapstests zonder familiegeschiedenis van CF, worden vermeld in [Tabel 1](#).

Tabel 1 Algemene frequentie van dragers van een CF-mutatie in verschillende etnische groepen in de VS.<sup>10</sup>

Etnische groep	Waargenomen dragerfrequentie
Afro-Amerikaans	1 op 84
Asjkenazisch-Joods	1 op 29
Aziatisch	1 op 242
Indo-Europees	1 op 28
Latijns-Amerikaans	1 op 59
Joods	1 op 32
Midden-Oosters	1 op 91
Inheems Amerikaans	1 op 70
Zuid-Aziatisch	1 op 118
Overige etniciteit	1 op 111
Overige etniciteit: > 1 Etniciteit	1 op 34
Overige etniciteit: Deels Afro-Amerikaans	1 op 56
Overige etniciteit: Deels Indo-Europees	1 op 32
Overige etniciteit: Deels Latijns-Amerikaans	1 op 51
Niet beschikbaar	1 op 37
Alle personen	1 op 38

## Samenvatting en uitleg van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

### Overzicht van het CFTR2-project

Het CFTR2-project is een internationaal initiatief onder leiding van een team van onderzoekers en klinici en ondersteund door een subsidie van het National Institute of Health en de Cystic Fibrosis Foundation in de Verenigde Staten.<sup>11,12</sup> Het doel van CFTR2 is om uitgebreide en door experts beoordeelde functionele en klinische informatie te verstrekken over CFTR-varianten. In een poging om alle CF-varianten met alle frequenties van 0,01% en hoger klinisch te valideren, hebben 25 CF-organisaties en klinieken van over de hele wereld<sup>13</sup> hun middelen gebundeld met als doel klinische informatie van meer dan 39.000 CF-patiënten te vergelijken met de bijna 1900 CF-varianten die door de jaren heen zijn opgenomen in de CFTR1-database van het Hospital for Sick Children in Toronto.<sup>11,13</sup> De klinische kenmerken, zoals de concentratie van chloride in zweet, longfunctie (FEV1% voorspeld) en pancreasstatus, werden naast informatie over het CFTR-genotype

geanalyseerd. De systematische benadering van het gelijktijdig analyseren van deze varianten vanuit klinisch, functioneel en genetisch perspectief leverde 134 unieke CF-veroorzakende varianten op in 129 unieke genomische posities (omdat voor vijf posities twee nucleotideveranderingen in dezelfde positie verschijnen) die zijn opgenomen in de CFTR2-database (sinds augustus 2013). Het gebruik van een panel dat al deze varianten omvat, veroorzaakt naar verwachting 95,4% van de allelen die cystische fibrose veroorzaken en verbetert de identificatie van de paren die risico lopen door detectie van beide allelen tot ~91% van 72% met behulp van het door het ACMG aanbevolen panel van 23 varianten.

## CFTR-varianten in panel

De varianten gerapporteerd door de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay zijn specifiek gekozen omdat ze de volledige set van klinisch gevalideerde varianten vertegenwoordigen die als CFTR-veroorzakend zijn geclassificeerd in de CFTR2-database (sinds augustus 2013) van de Johns Hopkins University, een product van het CFTR2-initiatief (Clinical and Functional Translation of CFTR).

De assay test op: 134 CF-veroorzakende varianten, één door het ACMG aanbevolen panelvariant (R117H; deze is door CFTR2 geclassificeerd als een mutatie met variërende klinische gevolgen [MVCC, Mutation of Varying Clinical Consequence]), één voorwaardelijk gerapporteerde modificerende variant (PolyTG/PolyT) en drie voorwaardelijk gerapporteerde goedaardige varianten (I506V, I507V, F508C)<sup>14</sup> voor in totaal 139 gerapporteerde varianten.

De 134 CF-veroorzakende varianten komen overeen met 129 CF-veroorzakende varianten in de CFTR2-database. De CFTR2-database bevat vijf CF-veroorzakende varianten waarvoor dezelfde verandering in eiwitniveau kan ontstaan door twee verschillende nucleotideveranderingen (bijv. S466X(C>A) en S466X(C>G)). Deze vijf varianten worden vermeld volgens het aminozuurcodon in de CFTR2-database (bijv. S466X), terwijl de assay elke individuele variant rapporteert (bijv. S466X(C>A) en S466X(C>G)). De lijst met 139 varianten die door de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay worden gerapporteerd, is te vinden in [Tabel 2](#). Vetgedrukt=ACMG-23; Cursief=Voorwaardelijk gerapporteerd.

Tabel 2 Cystic Fibrosis 139-Variant Assay Samenvatting van varianten\*

M1V (c.1A>G)	T338I (c.1013C>T)	<b>R553X (c.1657C&gt;T)</b>	3272-26A>G (c.3140-26A>G)
CFTRdele2,3 (c.54-5940_273+10250del21kb)	S341P (c.1021T>C)	A559T (c.1675G>A)	L1065P (c.3194T>C)
Q39X (c.115C>T)	1154insTC (c.1022_1023insTC)	<b>R560T (c.1679G&gt;C)</b>	R1066C (c.3196C>T)
E60X (c.178G>T)	R347H (c.1040G>A)	R560K (c.1679G>A)	R1066H (c.3197G>A)
P67L (c.200C>T)	<b>R347P (c.1040G&gt;C)</b>	1811+1.6kbA>G (c.1679+1.6kbA>G)	L1077P (c.3230T>C)

R75X (c.223C>T)	R352Q (c.1055G>A)	1812-1G>A (c.1680-1G>A)	W1089X (c.3266G>A)
<b>G85E (c.254G&gt;A)</b>	1213delT (c.1081delT)	E585X (c.1753G>T)	Y1092X(C>A) (c.3276C>A)
394delTT (c.262_263delTT)	1248+1G>A (c.1116+1G>A)	<b>1898+1G&gt;A</b> <b>(c.1766+1G&gt;A)</b>	Y1092X(C>G) (c.3276C>G)
405+1G>A (c.273+1G>A)	1259insA (c.1127_1128insA)	1898+3A>G (c.1766+3A>G)	M1101K (c.3302T>A)
406-1G>A (c.274-1G>A)	W401X (c.1202G>A)	2143delT (c.2012delT)	E1104X (c.3310G>T)
E92X (c.274G>T)	W401X (c.1203G>A)	2183AA >G (c.2051_2052delAAinsG)	R1158X (c.3472C>T)
E92K (c.274G>A)	1341+1G>A (c.1209+1G>A)	<b>2184delA</b> <b>(c.2052delA)</b>	<b>R1162X (c.3484C&gt;T)</b>
Q98X (c.292C>T)	1461ins4 (c.1329_1330insAGAT)	2184insA (c.2052_2053insA)	<b>3659delC</b> <b>(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</b> <b>(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</b> <b>(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</b> <b>(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)	

\* Varianten worden weergegeven in volgorde van genomische coördinaten. De bijbehorende verandering in het nucleotideniveau voor elke variant staat tussen haakjes genoemd.

<sup>†</sup> Geclassificeerd in de CFTR2-database<sup>12</sup> als een CF-veroorzakende variant, terwijl de variant in het artikel van Sosnay et al.<sup>13</sup> als onbepaald wordt geclassificeerd. De databaseclassificatie is actueler en weerspiegelt de voltooide functionele test, die niet beschikbaar was op het moment van de Sosnay-publicatie.

# Samenvatting en uitleg van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

## Ontwerp van de assay

Alle eiwitcoderende gebieden in het CFTR-gen, inclusief 10 nt flankerende intronische sequentie, worden gedetecteerd voor alle exonen, behalve voor drie exonen (exon 7, 10 en 20). Voor exon 7 en exon 10 is slechts 5 nt flankerende intronische sequentie opgenomen aan het 5'-uiteinde van het exon om proximale homopolymere indels te vermijden. Voor exon 20 is 30 nt flankerende intronische sequentie opgenomen aan het 5'-uiteinde van het exon om de mutatie 3272-26A>G te kunnen detecteren. Daarnaast detecteert de assay ook ~100 nt flankerende sequentie op de 5'- en 3'-UTR's, twee diepe intronische mutaties (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T), twee grote deleties (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) en de PolyTG/PolyT-regio. De volledige dekking van de assay wordt weergegeven in de genomische coördinaatposities die in [Tabel 3](#) worden vermeld.

**OPMERKING** Er zijn beperkingen voor de detectie van deleties op specifieke genomische locaties binnen de gesequencede regio's van deze assay (zie [Beperkingen van de procedure Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay op pagina 12](#)).

Tabel 3 Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay Dekking genomische coördinatie

	Start genomische coördinaat hg19 (chr7)	Stop genomische coördinaat hg19 (chr7)	Lengte (basepaar)
CFTR_Exon 1	117120041	117120211	171
CFTR_Exon 2	117144297	117144427	131
CFTR_Exon 3	117149078	117149206	129
CFTR_Exon 4	117170943	117171178	236
CFTR_Exon 5	117174320	117174429	110
CFTR_Exon 6	117175292	117175475	184
CFTR_Exon 7 <sup>^</sup>	117176597	117176737	141
CFTR_Exon 8	117180144	117180410	267
CFTR_Exon 9	117182060	117182172	113
CFTR_Exon 10 <sup>^</sup>	117188690	117188887	198
CFTR_Exon 11	117199508	117199719	212
CFTR_Exon 12	117227783	117227897	115



	Start genomische coördinaat hg19 (chr7)	Stop genomische coördinaat hg19 (chr7)	Lengte (basepaar)
CFTR_Intron 12*	117229516	117229526	11
CFTR_Exon 13	117230397	117230503	107
CFTR_Exon 14	117231978	117232721	744
CFTR_Exon 15	117234974	117235122	149
CFTR_Exon 16	117242870	117242927	58
CFTR_Exon 17	117243576	117243846	271
CFTR_Exon 18	117246718	117246817	100
CFTR_Exon 19	117250563	117250733	171
CFTR_Exon 20 <sup>#</sup>	117251605	117251872	268
CFTR_Exon 21	117254657	117254777	121
CFTR_Exon 22	117267566	117267834	269
CFTR_Intron 22*	117280010	117280020	11
CFTR_Exon 23	117282482	117282657	176
CFTR_Exon 24	117292886	117292995	110
CFTR_Exon 25	117304732	117304924	193
CFTR_Exon 26	117305503	117305628	126
CFTR_Exon 27	117306952	117307262	311
<b>Totaal aantal basen</b>			<b>5203**</b>

^ Voor Exon 7 en Exon 10 is slechts 5 nt flankerende intronsequentie stroomopwaarts van het exon opgenomen om homopolymere stukken in deze regio's te voorkomen. In het geval van Exon 10 is dit de PolyT/Poly TG-regio in Intron 9. Dit gebied wordt specifiek en afzonderlijk behandeld.

\* Voor de diepe intronische mutaties zijn ook 5 nt opgenomen die de SNV aan weerszijden flankeren.

# Voor Exon 20 is 30 nt flankerende intronische sequentie opgenomen aan het 5'-uiteinde van het exon om detectie van de mutatie 3272-26A>G mogelijk te maken.

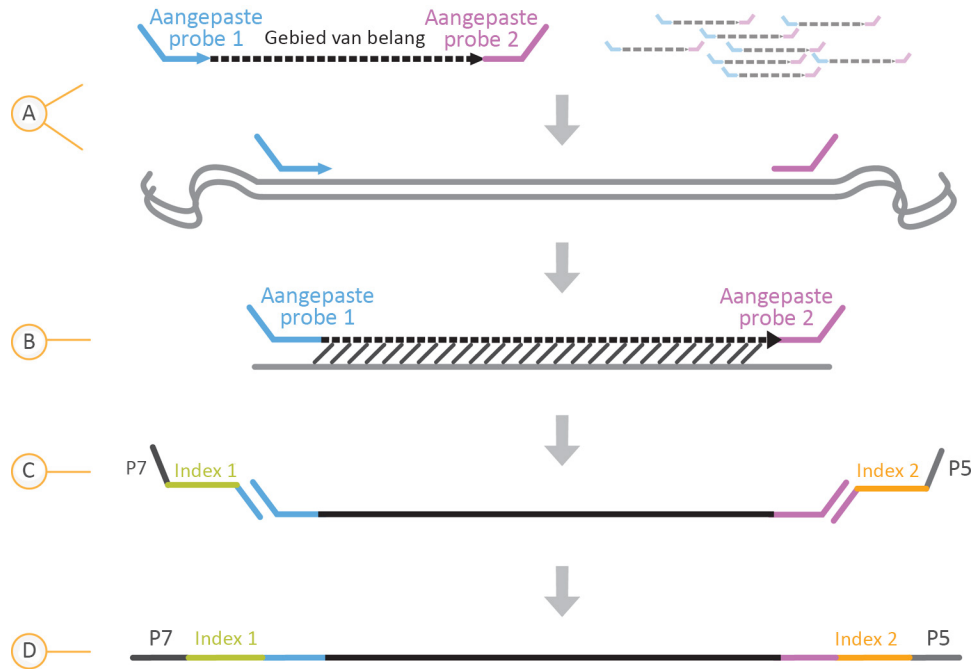
\*\* Met de twee grote deleties en de PolyTG/PolyT-regio's is het totale aantal posities/regio's 5206.

## Principes van de procedure

De TruSight Cystic Fibrosis Library Prep is bedoeld voor het handmatig voorbereiden van bibliotheken die worden gebruikt voor het sequencen van DNA uit perifere volbloedmonsters. De bibliotheekvoorbereiding bestaat uit vier belangrijke stappen: hybridisatie, extension-ligatie, PCR-amplificatie en bibliotheeknormalisatie.

**OPMERKING** De procedures voor bibliotheekvoorbereiding voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en de Clinical Sequencing Assay zijn identiek.

## Bibliotheekvoorbereiding



- Hybridisatie:** tijdens de eerste stap, hybridisatie, wordt een pool van stroomopwaartse en stroomafwaartse oligonucleotiden gehybridiseerd die specifiek zijn voor het cystische-fibrose-gen naar het genomische input-DNA. Aan het einde van dit proces verwijdt een wasprocedure, gebruikmakend van een filter waarmee de grootte kan worden geselecteerd, ongebonden oligonucleotiden in drie stappen uit het genomische DNA.
- Extensie-ligatie:** tijdens de tweede stap, extensie-ligatie, worden de gehybridiseerde stroomopwaartse en stroomafwaartse oligonucleotiden met elkaar verbonden. Een DNA polymerase strekt zich uit (extensie) van de stroomopwaartse oligonucleotiden door de doelregio, gevolgd door ligatie naar het 5'-uiteinde van het stroomafwaartse oligonucleotide met behulp van een DNA-ligase. Het resultaat is de vorming van producten die de CF-specifieke oligonucleotiden bevatten, geflankeerd door sequenties die nodig zijn voor amplificatie.
- PCR-amplificatie:** tijdens de derde stap, PCR-amplificatie, worden de extensie-ligatie-producten geamplificeerd met behulp van indexadapters die indexsequenties toevoegen voor monstermultiplexing en algemene adapters die nodig zijn voor clustergeneratie op de MiSeqDx. Aan het einde van dit proces zuivert een PCR-opschoningsprocedure de PCR-producten (bibliotheek genoemd).
- Bibliotheeknormalisatie:** tijdens de laatste stap, bibliotheeknormalisatie, wordt de hoeveelheid van elke bibliotheek genormaliseerd, om te zorgen voor een meer gelijkwaardige bibliotheekrepresentatie in de uiteindelijke gepoolde bibliotheek. Aan het einde van dit proces wordt de gepoolde bibliotheek op de MiSeqDx geladen voor sequencing met behulp van SBS-chemie.

## Sequencing

SBS-chemie maakt gebruik van een omkeerbare terminatormethode om eenvoudige nucleotidebasen te detecteren wanneer ze worden opgenomen in groeiende DNA-strengen. Tijdens elke sequencing-cyclus wordt een enkel fluorescent gelabeld deoxynucleotidetrifosfaat (dNTP) aan de nucleïnezuurketen toegevoegd. Het nucleotidelabel dient als een terminator voor de polymerisatie. Dit betekent dat er na elke opname van dNTP een beeld van de fluorescerende kleurstof wordt gevormd om de base te identificeren, waarna de fluorescerende kleurstof enzymatisch wordt gesplitst om opname van het volgende nucleotide mogelijk te maken. Omdat alle vier omkeerbare terminator-gebonden dNTP's (A, G, T, C) aanwezig zijn als enkele, afzonderlijke moleculen, minimaliseert natuurlijke concurrentie de opnamefouten. Basebepalingen worden direct gedaan op basis van signaalintensiteitsmetingen tijdens elke sequencing-cyclus. Het resultaat is base-by-base sequencing.

## Gegevensanalyse

De eerste stap van de gegevensanalyse wordt de primaire analyse genoemd. Tijdens deze stap, die wordt uitgevoerd door software voor Real-Time Analysis (RTA), worden basebepalingen en kwaliteitsscores gegenereerd. Tijdens de volgende stap, de secundaire analyse, worden de basebepalingen die tijdens de primaire analyse zijn gegenereerd, verwerkt om informatie voor elk monster te produceren. De secundaire analyse wordt uitgevoerd door de Local Run Manager-software en omvat demultiplexing, het genereren van FASTQ-bestanden, uitlijning, variantbepaling, en het genereren van VCF-bestanden die gegevens bevatten over varianten die op specifieke posities in het referentiegenoom worden gevonden.

- **Demultiplexen:** als de run meerdere monsters bevat en de run indexbepalingen heeft, is dit de eerste stap in de secundaire analyse. Tijdens het demultiplexen worden gegevens van gepoolde monsters gescheiden op basis van de unieke sequentie-indexen die zijn toegevoegd tijdens de PCR-amplificatiestap.
- **FASTQ-bestandsgeneratie:** na het demultiplexen genereert de Local Run Manager tussenbestanden met FASTQ-indeling, een tekstindeling die wordt gebruikt om sequenties weer te geven. FASTQ-bestanden bevatten de bepalingen voor elk monster en de kwaliteitsscores, met uitzondering van de bepalingen van clusters die niet door het filter zijn doorgelaten.
- **Uitlijning:** tijdens het uitlijnen worden sequenties vergeleken met de referentie om een relatie tussen de sequenties te identificeren en wordt een score toegekend op basis van gelijksoortige regio's. Uitgelijnde bepalingen worden weggeschreven naar bestanden met een BAM-indeling. Voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, voert een gebandeerde Smith-Waterman-algoritme lokale semiglobale sequentie-uitlijningen uit om gelijksoortige gebieden tussen twee sequenties te bepalen.
- **Variantbepaling:** tijdens deze stap worden eenvoudige nucleotidevarianten (SNV), inserties en deleties (indels) en andere structurele varianten vastgelegd in een gestandaardiseerd tekstbestand met de naam `TruSightCF139VariantAssay.txt` voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay of `TruSightCFClinicalSequencingAssay.txt` voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.

Raadpleeg de handleidingen van de analysesoftware die met uw MiSeqDx is geïnstalleerd voor meer informatie over de analyseworkflow. Voor de *Workflowhandleiding voor analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager*, zie documentnr. 1000000100945. Voor de *Workflowhandleiding voor analysemodule CF Clinical Seq*

2.0 in Local Run Manager zie documentnr. 1000000100946. Voor de Workflowhandleiding voor analysemodule CF 139-variant 2.0 Micro in Local Run Manager, zie documentnr. 200017946.. Voor de Workflowhandleiding voor analysemodule CF Clinical Seq 2.0 Micro in Local Run Manager zie documentnr. 200017945.

## Beperkingen van de procedure Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

- Bestemd voor *in-vitro*diagnostiek.
- De verkregen resultaten met behulp van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay moeten worden gebruikt en geïnterpreteerd in de context van een volledige klinische evaluatie.
- De assay is ontworpen om een specifieke subset van bekende varianten in het CFTR-gen te identificeren, maar omvat niet alle varianten die in het CFTR-gen zijn geïdentificeerd. In het bijzonder rapporteert de assay alleen veranderingen in aminozuurniveaus als deze verband houden met de nucleotideveranderingen zoals vermeld in [Tabel 2](#). Hoewel andere veranderingen in het nucleotideniveau kunnen leiden tot dezelfde veranderingen in het aminozuurniveau, worden deze niet door de assay gerapporteerd. Dit betekent dat als een variant niet wordt geïdentificeerd, dit niet garandeert dat er geen andere CFTR-varianten aanwezig zijn in de monsters die worden geanalyseerd.
- Varianten die door deze assay worden geïdentificeerd, variëren in frequentie tussen verschillende populaties.
- Zoals bij elke op hybridisatie gebaseerde assay kunnen onderliggende polymorfismen of varianten in oligonucleotide-bindende regio's invloed hebben op de allelen die worden onderzocht en dus op de uitgevoerde bepalingen.
- De assay kan niet bepalen of de oriëntatie van de PolyTG/PolyT-variant in cis/trans is ten opzichte van de R117H-variant. Voor patiënten met een R117H-variant moeten er aanvullende tests worden uitgevoerd om te bepalen of een PolyTG/PolyT-variant, die het klinische fenotype kan beïnvloeden (bijv. 12–13 (TG) of 5T), zich in een cis/trans-oriëntatie bevindt ten opzichte van de R117H-variant.
- PolyTG/PolyT zijn homopolymere regio's waarvan bekend is dat ze moeilijk te interpreteren zijn met op sequencing gebaseerde assays vanwege polymerase-slippage. Er werd een percentage onjuiste bepalingen van 0,9% (4/448) waargenomen voor PolyTG/PolyT-resultaten die een TG-verschil van  $\pm 1$  lieten zien in vergelijking met de bidirectionele Sanger-sequencing in [Tabel 16](#).

## Beperkingen van de procedure Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

- Bestemd voor *in-vitro*diagnostiek.

- De verkregen resultaten met behulp van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay moeten worden gebruikt en geïnterpreteerd in de context van een volledige klinische evaluatie.
- De assay sequencet de volgende regio's binnen het CFTR-gen:
  - Alle eiwitcoderende regio's in het CFTR-gen voor 27 exons.
  - Tussen 5 en 10 basen van flankerende intronische sequentie.
  - 100 nucleotiden van intronische sequentie in de 5' en 3' niet-getransleerde regio's.
  - Twee diepe intronische mutaties (1811+1,6kbA>G, 3489+10kbC>T).
  - De PolyTG/PolyT-sequentie die zich in intron 9 bevindt.
  - In totaal 5206 posities/regio's van de mogelijke 188.702 basenparen in het gen.
- De assay is ontworpen om de sequentie van eiwitcoderende gebieden en intron-/exongrenzen van het CFTR-gen te bepalen en omvat niet alle intronische regio's en grote deleties. Daarom garandeert een algemeen wild-type resultaat niet dat er geen andere mutaties/varianten van de cystische fibrose transmembraan geleidingsregulator (CFTR) aanwezig zijn in de geanalyseerde monsters.
  - De assay is ontworpen om twee specifieke grote deleties te detecteren: CFTRdele2,3 en CFTRdele22,23. De assay kan geen andere grote deleties detecteren of rapporteren. Deze assay is alleen gevalideerd voor inserties en deleties tot en met een grootte van 3 bp.
- Alle inserties/deleties worden links uitgelijnd in homopolymere regio's in plaats van rechts uitgelijnd volgens de HGVS-nomenclatuur. De variant c.313delA (met sequentiecontext GAATC) wordt bijvoorbeeld geïdentificeerd als een G-ATC-deletie, maar de deletie wordt in dbSNP gerapporteerd als een GA-TC-deletie. Een uitzondering hierop zijn de 135 CF-varianten die in CFTR2 als ziekteverwekkend worden vermeld (gebaseerd op variantdatabase versie 10/04/2012). Alle indels in homopolymere regio's binnen deze reeks variaties komen overeen met de verwachte variantrapportage volgens CFTR2.<sup>13</sup>
- De assay kent een beperking bij het detecteren van deleties op specifieke genomische locaties binnen de gesequencede regio's. Genomische coördinaten waarvoor de assay geen deleties kan rapporteren, worden vermeld in [Tabel 4](#). De assay kan geen deleties detecteren die de base of basen in de beperkingskolom bevatten.

Tabel 4 Genomische coördinaten waar deleties niet kunnen worden gedetecteerd

CFTR-genregio	Genomische coördinaten hg19 (chr7)
CFTR_Exon1	117120041; 117120211
CFTR_Exon3	117149091
CFTR_Exon4	117170953-117170954*; 117171082
CFTR_Exon5	117174362
CFTR_Exon6	117175417
CFTR_Exon7	117176621
CFTR_Exon8	117180176-117180177*

CFTR-genregio	Genomische coördinaten hg19 (chr7)
CFTR_Exon9	117182126
CFTR_Exon10	117188771
CFTR_Exon11	117199544-117199545*; 117199697
CFTR_Exon12	117227802
CFTR_Exon14	117232106-117232107*; 117232466-117232467*; 117232609
CFTR_Exon17	117243705; 117243843
CFTR_Exon18	117246751
CFTR_Exon19	117250688
CFTR_Exon20	117251788
CFTR_Exon22	117267721
CFTR_Exon23	117282597
CFTR_Exon24	117292953
CFTR_Exon25	117304740-117304741*; 117304869
CFTR_Exon26	117305518
CFTR_Exon27	117307178

\* Alleen deleties die beide hier vermelde basen bevatten, kunnen niet worden gedetecteerd. In Exon8 kunnen bijvoorbeeld alleen deleties  $\geq 2$  bp die de basen op beide genomische coördinaten 117180176 en 117180177 bevatten, niet worden gedetecteerd. Een enkele basedeletie op 117180176 of 117180177 kan worden gedetecteerd.

- Als de getroffen coördinaat in [Tabel 4](#) de meest linkse base is binnen een homopolymere regio, kan een deletie op een andere positie binnen het homopolymere gedeelte niet worden gedetecteerd omdat deze niet kan worden onderscheiden van een deletie op de betreffende coördinaat.
- De assay kan in totaal vijf varianten niet detecteren die worden vermeld in de klinische database van ClinVar (toegang gehad tot databaseversie december 2014). Deze vijf specifieke varianten zijn opgenomen in [Tabel 5](#). Deze assaybeperking heeft geen invloed op varianten die worden vermeld in de Cystic Fibrosis-database, CFTR2 (databaseversie 04/10/2012). Voor geen van de varianten waren frequentiegegevens beschikbaar.

Tabel 5 Bekende varianten niet gedetecteerd door de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Variant nr.	ClinVar ID	CFTR-genregio	Genomische locatie (Chr 7)	cDNA-naam (HGVS)	Eiwit-naam (HGVS)	rs ID
1	RCV000046424	CFTR_Exon3	117149091	c.168delA	p.Glu56Aspfs	rs397508269

Variant nr.	ClinVar ID	CFTR-genregio	Genomische locatie (Chr 7)	cDNA-naam (HGVS)	Eiwit-naam (HGVS)	rs ID
2	RCV000046687	CFTR_ Exon17	117243703-117243704*	c.2775_2776delTT	p.Leu926Alafs	rs397508433
3	RCV000046688	CFTR_ Exon17	117243705	c.2777delT	p.Leu926Cysfs	rs397508434
4	RCV000046782	CFTR_ Exon19	117250690*	c.3106delA	p.Thr1036Profs	rs397508497
5	RCV000046857	CFTR_ Exon20	117251789*	c.3294delG	p.Trp1098Cysfs	rs397508534

\* In deze gevallen vallen de getroffen coördinaten binnen een homopolymere regio.

- Varianten die door deze assay worden geïdentificeerd, variëren in frequentie tussen verschillende populaties. Het is niet mogelijk om alle combinaties van varianten die met deze assay in het CFTR-gen kunnen worden gedetecteerd, te valideren. Het wordt aanbevolen dat de gebruiker nieuwe en zeldzame varianten bevestigt met behulp van een gevalideerde referentiemethode.
- Zoals bij elke op hybridisatie gebaseerde assay kunnen onderliggende polymorfismen, mutaties, inserties of deleties in oligonucleotide-bindende regio's invloed hebben op de allelen die worden onderzocht en dus op de uitgevoerde bepalingen.
- Voor complexe varianten waarbij een deletie en insertie op dezelfde locatie plaatsvinden, kan de assay dit rapporteren als twee afzonderlijke varianten die dicht bij elkaar liggen. Variantfasering wordt niet geëvalueerd en andere mogelijke oplossingen voor de gedetecteerde sequentie moeten worden overwogen. Raadpleeg [Tabel 6](#) voor een voorbeeld van een dergelijke complexe variant.

Tabel 6 Complexe variant, voorbeeld

<b>Sequentiecontext (referentie)</b>	GAAGAAATT
<b>Waargenomen sequentie voor variant</b>	GAAT--ATT
<b>Verwachte variant</b>	Deletie van GAA, insertie van T (beide veranderingen op hetzelfde chromosoom)
<b>Variant(en) gerapporteerd door de assay</b>	SNP (G>T); Deletie van AA

- Als voor een monster meer dan twee varianten worden geïdentificeerd, wordt aanbevolen dat de gebruiker het resultaat verifieert door het monster opnieuw te analyseren met behulp van de MiSeqDx-instrument met een vers gDNA-extract om kruisbesmetting van het monster uit te sluiten.

**OPMERKING** Als er twee of meer varianten worden gedetecteerd, moet haplotype-fasering worden overwogen. Deze assay kan niet bepalen of varianten in cis/trans-positie zijn ten opzichte van andere varianten.

- De assay kan niet bepalen of de oriëntatie van de PolyTG/PolyT-variant in cis/trans-positie is ten opzichte van andere varianten. Voor patiënten met een R117H-variant moeten er aanvullende tests worden uitgevoerd om te bepalen of een PolyTG/PolyT-variant, die het klinische fenotype kan beïnvloeden (bijv. 12–13 (TG) of 5T), zich in een cis/trans-oriëntatie bevindt. PolyTG/PolyT zijn homopolymere regio's waarvan bekend is dat ze moeilijk te sequencen zijn vanwege polymerase-slippage.

## Productonderdelen

De TruSight Cystic Fibrosis Kit bestaat uit de volgende onderdelen:

- TruSight Cystic Fibrosis Library Prep (Catalogusnr. 20036925)

## Meegeleverde reagentia

Reagentia voor de TruSight Cystic Fibrosis Library Prep worden geleverd door Illumina. De kit is geconfigureerd voor 1–4 toepassingen met maximaal 96 monsters per kit.

## TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, doos 1 nr. 20036244

Reagentia in doos 1 worden ingevroren verzonden en zijn stabiel bij opslag bij -25 °C tot -15 °C. De reagentia zijn stabiel gedurende maximaal zes vries-dooicycli tot de gespecificeerde vervaldatum.

Tabel 7 Doos 1A Reagentia vóór amplificatie, nr. 20036207

Onderdeel	Aantal	Vulvolume	Werkzame bestanddelen	Opslag
Oligo pool voor cystische fibrose	1 buisje	600 µl	Gebufferde waterige oplossing met oligonucleotiden gericht op het <i>CFTR</i> -gen.	-25 °C tot -15 °C
Hybridization Buffer	1 buisje	4,32 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten en formamide bevat.	-25 °C tot -15 °C
Extensie-Ligation Mix	1 buisje	4,8 ml	Gebufferde waterige oplossing met een gepatenteerd mengsel van DNA polymerases, DNA-ligase en dNTP's.	-25 °C tot -15 °C



Onderdeel	Aantal	Vulvolume	Werkzame bestanddelen	Opslag
Index 2-primers (A501–A508)	1 buisje per primer	192 µl	PCR primers met indexsequenties en sequencing-adapters.	-25 °C tot -15 °C
Index 1-primers (A701–A712)	1 buisje per primer	128 µl	PCR primers met indexsequenties en sequencing-adapters.	-25 °C tot -15 °C
PCR Polymerase	1 buisje	56 µl	Gepatenteerde DNA polymerase.	-25 °C tot -15 °C
PCR Master Mix	1 buisje	2,8 ml	Gebufferde waterige oplossing die zouten en dNTP's bevat.	-25 °C tot -15 °C

Tabel 8 Doos 1B Reagentia na amplificatie, nr. 20036208

Onderdeel	Aantal	Vulvolume	Werkzame bestanddelen	Opslag
Library Normalization Diluent	1 buisje	4,6 ml	Gebufferde waterige oplossing met zouten, 2-mercapto-ethanol en formamide.	-25 °C tot -15 °C
Library Dilution Buffer	1 buisje	4,5 ml	Gebufferde waterige oplossing.	-25 °C tot -15 °C
PhiX Internal Control Bibliotheek	1 buisje	10 µl	Gebufferde waterige oplossing met PhiX genomisch DNA.	-25 °C tot -15 °C

## TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, doos 2 # 20036209

De reagentia in doos 2 worden op kamertemperatuur verzonden en zijn bij opslag tussen 15 °C en 30 °C stabiel tot de gespecificeerde vervaldatum.

Tabel 9 Doos 2 Reagentia vóór amplificatie

Onderdeel	Aantal	Vulvolume	Werkzame bestanddelen	Opslag
Filterplaat	4 platen	Niet van toepassing	Microplaat van polypropyleen met een gemodificeerd polyethersulfonmembraan.	15 °C tot 30 °C

Tabel 10 Doos 2 Reagentia na amplificatie

Onderdeel	Aantal	Vulvolume (ml)	Werkzame bestanddelen	Opslag
Elution Buffer	1 buisje	4,8	Gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C
Library Storage Buffer	1 buisje	3,5	Gebufferde waterige oplossing	15 °C tot 30 °C

## TruSight Cystic Fibrosis Library Prep, doos 3 nr. 20036250

De reagentia in doos 3 worden gekoeld verzonden en zijn bij opslag tussen 2 °C en 8 °C stabiel tot de gespecificeerde vervaldatum.

Tabel 11 Doos 3A Reagentia vóór amplificatie, nr. 20036251

Onderdeel	Aantal	Vulvolume (ml)	Werkzame bestanddelen	Opslag
Stringent Wash Buffer	1 fles	24	Gebufferde waterige oplossing met zouten, 2-mercapto-ethanol en formamide.	2 °C tot 8 °C
Universal Wash Buffer	1 buisje	4,8	Gebufferde waterige oplossing die zouten bevat.	2 °C tot 8 °C

Tabel 12 Doos 3B Reagentia na amplificatie, nr. 20036245

Onderdeel	Aantal	Vulvolume (ml)	Werkzame bestanddelen	Opslag
PCR Clean-Up Beads	1 buisje	5	Gebufferde waterige oplossing met paramagnetische parels in de vaste fase en polyethyleenglycol.	2 °C tot 8 °C
Library Normalization Wash	2 buisjes	4,8	Gebufferde waterige oplossing met zouten, 2-mercapto-ethanol en formamide.	2 °C tot 8 °C
Library Beads	1 buisje	1,2	Gebufferde waterige oplossing met paramagnetische parels in de vaste fase.	2 °C tot 8 °C

## Benodigde, maar niet meegeleverde reagentia

### Reagentia vóór amplificatie

- 10 N NaOH (bereiden met tabletten of een standaardoplossing gebruiken)
- TE Buffer
- RNase/DNase-free water

### Reagentia na amplificatie

- 10 N NaOH (bereiden met tabletten of een standaardoplossing gebruiken)
- Ethanol (EtOH), 200 proof, voor moleculaire biologie
- TE Buffer
- RNase/DNase-free water

### MiSeqDx-reagentia

- MiSeqDx Reagent Kit v3 (catalogusnr. 20037124) of MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (catalogusnr. 20063860)
- 5% natriumhypochloriet
- Tween 20
- Water van laboratoriumkwaliteit

### Opslag en hantering

1. Kamertemperatuur wordt gedefinieerd als 15 °C tot 30 °C.
2. De reagentia van Hybridization Buffer, Stringent Wash Buffer en Library Normalization Diluent kunnen zichtbare neerslag of kristallen vormen. Vortex krachtig vóór gebruik en controleer de buffer visueel op neerslag.
3. Houd u aan de volgende best practices bij het hanteren van PCR Clean-Up Beads en Library Beads:
  - De parels mogen nooit worden ingevroren.
  - Laat de parels op kamertemperatuur komen.
  - Vortex de parels direct vóór gebruik tot ze goed gesuspenseerd zijn en de kleur homogeen is.

- Meng het monster grondig nadat de parels zijn toegevoegd door 10 keer op en neer te pipetteren. Voor het mengen van monsters kan een schudapparaat worden gebruikt.
  - Incubeer het parel/monster-mengsel bij kamertemperatuur gedurende de volledige aangegeven duur.
  - Volg de instructies bij het gebruik van de magnetische standaard. Wacht tot de oplossing helder is voordat u deze aspireert. Houd de plaat op de magnetische standaard wanneer u het supernatant langzaam aspireert en zorg ervoor dat u de gescheiden parels niet verstoort.
4. Vries de Library Beads niet in en meng ze niet met het Library Normalization Diluent-reagens als ze niet onmiddellijk worden gebruikt.

## Apparatuur en materialen

### Benodigde apparatuur en materialen, apart verkrijgbaar

- MiSeqDx-instrument, Catalogusnr. DX-410-1001
- TruSeq Index Plate Fixture Kit, catalogusnr. FC-130-1005
- TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit, catalogusnr. FC-130-1007
- Index Adapter Replacement Caps, catalogusnr. DX-502-1003
- MiSeq Tube, catalogusnr. MS-102-9999

### Benodigde, maar niet meegeleverde apparatuur en materialen

#### Apparatuur en materialen voor pre-amplificatie

- **Verwarmingsblok:** er is één verwarmingsblok voor een plaat met 96 putjes nodig. Verwarmingsblokken met verwarmde deksels zijn geschikt voor gebruik. Het gebruik van thermocyclers of verwarmingsblokken met actieve koeling (bijv. Peltier, thermo-elektrisch gekoeld) wordt niet aanbevolen voor de hybridisatiestap. De stap van passieve koeling is van cruciaal belang voor een goede hybridisatie. Het verwarmingsblok moet voldoen aan de volgende prestatiespecificaties:
  - Temperatuurbereik: Omgevingstemperatuur +5 °C tot 99 °C
  - Temperatuurregeling: ±0,1 °C bij 37 °C; ±0,4 °C bij 60 °C
- **Monsterincubator:** er is één incubator (hybridisatieoven) nodig. De incubator moet voldoen aan de volgende prestatiespecificaties:

- Temperatuurbereik: Omgevingstemperatuur +10 °C tot 100 °C
- Temperatuurregeling:  $\pm 0,2$  °C
- **Tafelcentrifuge:** er is een tafelcentrifuge nodig die een temperatuur van 20 °C kan vasthouden. Er is een afzonderlijke centrifuge nodig in het post-amplificatiegebied. Elke plaatcentrifuge waarin een plaat met 96 putjes met filtereenheid past en die de aangegeven snelheden van het protocol haalt (280 tot 2400 × g) is geschikt.
- **Precisiepipetten:** er is één set precisiepipetten nodig. Een afzonderlijke set is nodig in het post-amplificatiegebied. Het gebruik van precisiepipetten is vereist om een nauwkeurige reagens- en monsterafgifte te garanderen. Een- of meerkanaalspipetten kunnen worden gebruikt als ze regelmatig worden gekalibreerd en nauwkeurig zijn binnen 5% van het aangegeven volume.
- **Verbruiksartikelen:** de volgende verbruiksartikelen zijn nodig:
  - PCR-platen met 96 putjes, 0,2 ml, polypropyleen of gelijkwaardig
  - Opslagplaten met 96 putjes, 0,8 ml (MIDI-platen)
  - Oplossingsbassin, PVC, DNase, RNase-vrij (bak)
  - Zelfklevende aluminium afsluitfolie
  - Geschikte PCR-plaatafsluiting
  - Aerosolbestendige pipettips
  - Conische buisjes, 15 ml

## Apparatuur en materialen voor post-amplificatie

- **Thermocycler:** er is één thermocycler nodig. De thermocycler moet een verwarmd deksel hebben en aan de volgende prestatiespecificaties voldoen:
  - Temperatuurregelingsbereik: 4 °C tot 99 °C
  - Nauwkeurigheid van de controle:  $\pm 0,25$  °C vanaf 35 °C tot 99 °C
- **Microplaatschudapparaat:** er is één microplaatschudapparaat nodig in het laboratoriumgebied voor post-amplificatie. Het plaatschudapparaat moet voldoen aan de volgende prestatiespecificaties:
  - Max. toerental voor schudden: 3000 tpm
  - Toerentalbereik voor mengen: 200 tpm tot 3000 tpm
- **Tafelcentrifuge:** er is één tafelcentrifuge nodig die een temperatuur van 20 °C kan vasthouden. Er is een afzonderlijke centrifuge nodig in het pre-amplificatiegebied. Elke plaatcentrifuge die de aangegeven snelheden van het protocol haalt (280 tot 2400 × g) is geschikt.
- **Verwarmingsblok:** er is één verwarmingsblok nodig voor de buisjes. Het verwarmingsblok moet voldoen aan de volgende prestatiespecificaties:
  - Temperatuurbereik: Omgevingstemperatuur +5 °C tot 99 °C
  - Temperatuurregeling:  $\pm 0,1$  °C bij 37 °C;  $\pm 0,4$  °C bij 60 °C

- **Magnetische standaard:** er is één magnetische standaard voor een plaat met 96 putjes nodig. Er worden betere prestaties behaald wanneer de magneten zich aan de zijkant van de standaard bevinden in plaats van de onderkant.
- **Precisiepipetten:** er is één set precisiepipetten nodig. Een afzonderlijke set is nodig in het pre-amplificatiegebied. Het gebruik van precisiepipetten is vereist om een nauwkeurige reagens- en monsterafgifte te garanderen. Een- of meerkanaalspipetten kunnen worden gebruikt als ze regelmatig worden gekalibreerd en nauwkeurig zijn binnen 5% van het aangegeven volume.
- **Tafelcentrifuge:** er is een temperatuurgecontroleerde centrifuge nodig die 20 °C kan handhaven en geschikt is voor microcentrifugebuisjes. Elke centrifuge die de aangegeven snelheden van het protocol haalt (280 tot 1000 × g) is geschikt.
- **Verbruiksartikelen:** de volgende verbruiksartikelen zijn nodig:
  - PCR-platen met 96 putjes, 0,2 ml, polypropyleen of gelijkwaardig
  - Opslagplaten met 96 putjes, 0,8 ml (MIDI-platen)

**OPMERKING** Zorg ervoor dat de plaat met 96 putjes op de magnetische standaard past.

- Conische buisjes: 15 ml en 50 ml
- Microcentrifugebuisjes (aanbevolen met schroefdop)
- PCR-strips met 8 buisjes
- Oplossingsbassins, PVC, DNase, RNase-vrij (bak)
- Zelfklevende aluminium afsluitfolie
- Zelfklevende plaatafsluitingen voor eenmalig gebruik
- Aerosolbestendige pipettips

## Verzamelen, transport en opslag van monsters

### WAARSCHUWING

Hanteer alle monsters alsof het potentieel infectieuze stoffen zijn.

- Er kunnen volbloedmonsters verzameld in K2EDTA-buisjes worden gebruikt.
- Volbloedmonsters kunnen niet langer dan zeven dagen bij kamertemperatuur worden bewaard, tot 30 dagen op 2 °C tot 8 °C, of tot 30 dagen indien ingevroren op -25 °C tot -15 °C.
- Vervoer volbloed niet langer dan zeven dagen bij kamertemperatuur, 30 dagen bij 2 °C tot 8 °C of 30 dagen indien bevroren bij -25 °C tot -15 °C. Het vervoer van volbloed moet voldoen aan de landelijke, provinciale en lokale voorschriften voor het vervoer van etiologische middelen.
- Er werd geen nadelig effect op de assayprestaties waargenomen wanneer genomisch DNA aan zes vries-/dooicycli werd onderworpen.

- Er werd geen nadelig effect op de assayprestaties waargenomen met volbloedmonsters met verhoogd bilirubine, cholesterol, triglyceride, EDTA of hemoglobine.

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen



### LET OP

Op grond van federale Amerikaanse wetgeving mag dit apparaat alleen worden verkocht door of in opdracht van een arts of een andere beroepsbeoefenaar die daartoe bevoegd is volgens de wetgeving van de staat waarin deze persoon werkzaam is, met het oogmerk om het apparaat te gebruiken of te doen gebruiken.

### WAARSCHUWING

Hanteer alle monsters alsof het potentieel infectieuze stoffen zijn.

### WAARSCHUWING

Deze set reagentia bevat mogelijk gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en de ogen kan persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Draag beschermende hulpmiddelen, zoals oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas, die passen bij het blootstellingsrisico. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en voer deze af in overeenstemming met de geldende regionale, nationale en lokale wet- en regelgeving. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) door te zoeken op de productcode. (Raadpleeg [Meegeleverde reagentia op pagina 16](#) voor meer informatie.)

- Sommige componenten van deze assay bevatten 2-mercapto-ethanol, een reductiemiddel. Inademen, inslikken en contact met de huid en de ogen kan persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Gebruik het in een goed geventileerde ruimte en voer containers en ongebruikte inhoud af overeenkomstig de toepasselijke lokale overheidsregels met betrekking tot veiligheid. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) door te zoeken op de productcode. (Raadpleeg [Meegeleverde reagentia op pagina 16](#) voor meer informatie.)
- Sommige componenten van deze assay bevatten formamide, een alifatisch amide dat een waarschijnlijke reproductieve toxine is. Inademen, inslikken en contact met de huid en de ogen kan persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Draag beschermende hulpmiddelen, met inbegrip van oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en gooi ze weg in overeenstemming met de veiligheidsvoorschriften van de plaatselijke overheid. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) door te zoeken op de productcode. (Raadpleeg [Meegeleverde reagentia op pagina 16](#) voor meer informatie.)
- Meld ernstige incidenten in verband met dit product onmiddellijk aan Illumina en de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt gevestigd zijn.
- Hanteer alle monsters alsof het potentieel infectieuze stoffen zijn.

- Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de monsterkwaliteit aanzienlijk slechter zijn.
- Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en een laboratoriumjas bij het hanteren van monsters en assayreagentia. Was de handen grondig na het hanteren van monsters en assayreagentia.
- Gebruik geen assay-onderdelen waarvan de uiterste gebruiksdatum die op het label op de assaydoos staat vermeld, is verstreken. Wissel de assay-onderdelen van verschillende assaylots niet onderling uit. Assaylots staan vermeld op het label op de assaydoos.
- Om kwaliteitsverslechtering van het monster of het reagens te voorkomen, moeten alle natriumhypochlorietdampen volledig zijn verdwenen alvorens met het protocol te beginnen.
- Goede laboratoriumpraktijken en goede laboratoriumhygiëne zijn vereist om te voorkomen dat reagentia, instrumenten en genomische DNA-monsters worden verontreinigd door PCR-producten. PCR-verontreiniging kan onjuiste en onbetrouwbare resultaten veroorzaken.
- Veranderingen in het uiterlijk van de meegeleverde reagentia kunnen duiden op kwaliteitsverslechtering van de materialen. Als er sprake is van uiterlijke veranderingen (zoals duidelijke veranderingen in de kleur van het reagens of troebelheid als gevolg van microbiële verontreiniging), mogen de reagentia niet worden gebruikt.
- Om contaminatie te voorkomen, zorgt u ervoor dat u de pre-amplificatie- en post-amplificatiegebieden fysiek van elkaar scheidt en dat de gebieden zijn voorzien van speciale apparatuur (bijv. pipetten, pipettips, vortexer en centrifuge).
- Vermijd kruisbesmetting. Gebruik verse pipettips tussen monsters en tussen het doseren van reagentia. Meng monsters met een pipet en centrifugeer de plaat wanneer dat wordt aangegeven. Vortex de platen niet. Het gebruik van aerosolbestendige tips vermindert het risico op overdracht van amplicons en contaminatie tussen monsters onderling.
- De combinatie van indexen en monsters moet overeenkomen met de monsterinformatie die is ingevoerd voor de MiSeqDx-run. Verkeerde combinaties tussen de monsterinformatie en de lay-out van de plaat veroorzaken een minder positieve monsteridentificatie en onjuiste resultaatrapportage.
- Bereid altijd verse 80% ethanol voor de wasfasen. Ethanol kan water uit de lucht opnemen, wat de resultaten kan beïnvloeden.
- Houd u aan de aangegeven droogtijd na de stap met de magnetische standaard om ervoor te zorgen dat de ethanol volledig verdampt. Ethanolresten kunnen de prestaties van latere reacties beïnvloeden.
- Bewaar de assay-onderdelen op de aangegeven temperatuur in daarvoor aangewezen pre-amplificatie- en post-amplificatiegebieden.
- Herhaalde vries-dooicycli (maximaal 6) van de componenten uit Doos 1 brengen de integriteit van de assay niet in gevaar.
- De Oligo pool voor cystische fibrose en Hybridization Buffer niet mengen voor opslag. In combinatie wordt de Oligo pool voor cystische fibrose onstabiel, ook als deze in bevroren toestand wordt bewaard.



- Het gebruik van thermocyclers met actieve koeling (bijv. Peltier, thermo-elektrisch gekoeld) wordt niet aanbevolen voor de hybridisatiestap. De stap van passieve koeling is van cruciaal belang voor een goede hybridisatie.
- Altijd PCR Polymerase toevoegen aan de PCR Master Mix direct vóór gebruik. Sla het gecombineerde mastermengsel nooit op.
- Tijdens de bibliotheeknormalisatiestap is het van uiterst belang dat de bibliotheekparelpetlet volledig wordt geresuspendeerd. Dit is essentieel voor het bereiken van een consistente clusterdichtheid op de MiSeqDx-instrument-stroomcel.
- Houd u aan de aangegeven incubatietijden van de bibliotheeknormalisatiestap. Een onjuiste incubatie kan de bibliotheekrepresentatie en clusterdichtheid beïnvloeden.
- Vanwege het aantal plaatverplaatsingen en daardoor het risico op verontreiniging moet u uiterste zorg betrachten om de inhoud van monsterputjes volledig in de putjes te houden. De inhoud mag niet spetteren.
- De aanbeveling van 250 ng DNA-input zorgt voor variatie in de hoeveelheid DNA. De prestaties van de assay hangen af van dit inputniveau.
- Monstervarianten met de aanduiding No Call (Niet-bepaling) op het testrapport geven aan dat de gegevens voor die variantpositie niet voldeden aan de gedefinieerde sequencing-drempels. Rapporteer geen varianten met de aanduiding No Call, tenzij herhaalde tests waarden opleveren die voldoen aan gedefinieerde drempels en niet langer als No Call worden aangemerkt.

## Afkortingen

Tabel 13 TruSight Cystic Fibrosis Library Prep Afkortingen

Afkorting	Definitie
AMP	AMplification Plate (Amplificatieplaat)
CLP	CLean-up Plate (Opschoonplaat)
DAL	Diluted Amplicon Library (Verdunde ampliconbibliotheek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplaatteenheid)
HYB	HYBridization Plate (Hybridisatieplaat)
LNP	Library Normalization Plate (Bibliotheeknormalisatieplaat)
NTC	No Template Control (Niet-sjabloon gerelateerde controle)
PAL	Pooled Amplicon Library (Gepoolde ampliconbibliotheek)
SGP	StoraGe Plate (Opslagplaat)

## Aanvullende hulpmiddelen

De ondersteuningspagina's voor TruSight Cystic Fibrosis op de Illumina-website bieden software, trainingshulpmiddelen, informatie over productcompatibiliteit en de volgende documentatie. Controleer altijd de ondersteuningspagina's voor de meest recente versies.

Hulpmiddel	Beschrijving
<i>Workflowhandleiding voor analysemodule CF 139-Variant 2.0 in Local Run Manager (documentnr. 1000000100945)</i>	Bevat instructies voor het instellen van runparameters voor sequencing en analyse voor de analysemodule CF 139-Variant 2.0.
<i>Workflowhandleiding voor analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager (documentnr. 1000000100946)</i>	Bevat instructies voor het instellen van runparameters voor sequencing en analyse voor de analysemodule CF Clinical Seq 2.0.
<i>Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro-analysemodule workflowhandleiding (documentnr. 200017946)</i>	Bevat instructies voor het instellen van runparameters voor sequencing en analyse voor de micro-analysemodule CF 139-Variant 2.0.
<i>Workflowhandleiding voor micro-analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager (documentnr. 200017945)</i>	Bevat instructies voor het instellen van runparameters voor sequencing en analyse voor de micro-analysemodule CF Clinical Seq 2.0.
<i>Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx (documentnr. 1000000011880)</i>	Bevat instructies voor het aanmaken van een run, de monitoringstatus, het analyseren van sequencing-gegevens en het bekijken van de resultaten op het MiSeqDx-instrument.
<i>Referentiehandleiding MiSeqDx-instrument voor MOS v2 (documentnr. 1000000021961)</i>	Bevat instructies voor het instellen en uitvoeren van sequencing-runs, inclusief onderhoudsprocedures voor het MiSeqDx-instrument.

## Procedurele opmerkingen

- Illumina vereist dat in elke run één DNA-monster voor positieve controle en een negatieve controle (niet-sjabloon gerelateerde controle, NTC) wordt opgenomen. Dit wordt gedefinieerd als een reeks parallel verwerkte monsters. Het DNA-monster voor positieve controle moet een goed gekarakteriseerd monster

zijn met een of meer bekende CFTR-varianten. Illumina beveelt het gebruik van een wild-type controle aan. De wild-type controle moet als een monster worden uitgevoerd en mag de positieve of negatieve controle niet vervangen.

- Bewaar de assay-onderdelen op de aangegeven temperatuur in daarvoor aangewezen pre-amplificatie- en post-amplificatiegebieden.
- Herhaalde vries-dooicycli (maximaal 6) van de componenten uit Doos 1 brengen de integriteit van de assay niet in gevaar.

## Monstervoorbereiding

Voordat u begint met de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay of de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, moet u het DNA uit volbloed extraheren en kwantificeren.

- Hiervoor kunt u elke gevalideerde DNA-extractiemethode gebruiken.
- Kwantificeer het DNA met behulp van een spectrofotometer. Zorg ervoor dat de A260/A280 van het DNA-monster > 1,5 is. Normaliseer het DNA-monster tot 50 ng/μl. Elk monster vereist 5 μl genomisch DNA (totaal 250 ng).

## Doorvoercapaciteit van monsters

Voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay kan de monsterdoorvoer 24–96 monsters zijn met de MiSeqDx Reagent Kit v3 en 24–36 monsters met de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. De indexeringsprimers die tijdens PCR-amplificatie worden gebruikt, moeten worden gekozen op basis van de gewenste uiteindelijke monsterdoorvoer om ervoor te zorgen dat elke bibliotheek een unieke indexcombinatie gebruikt.

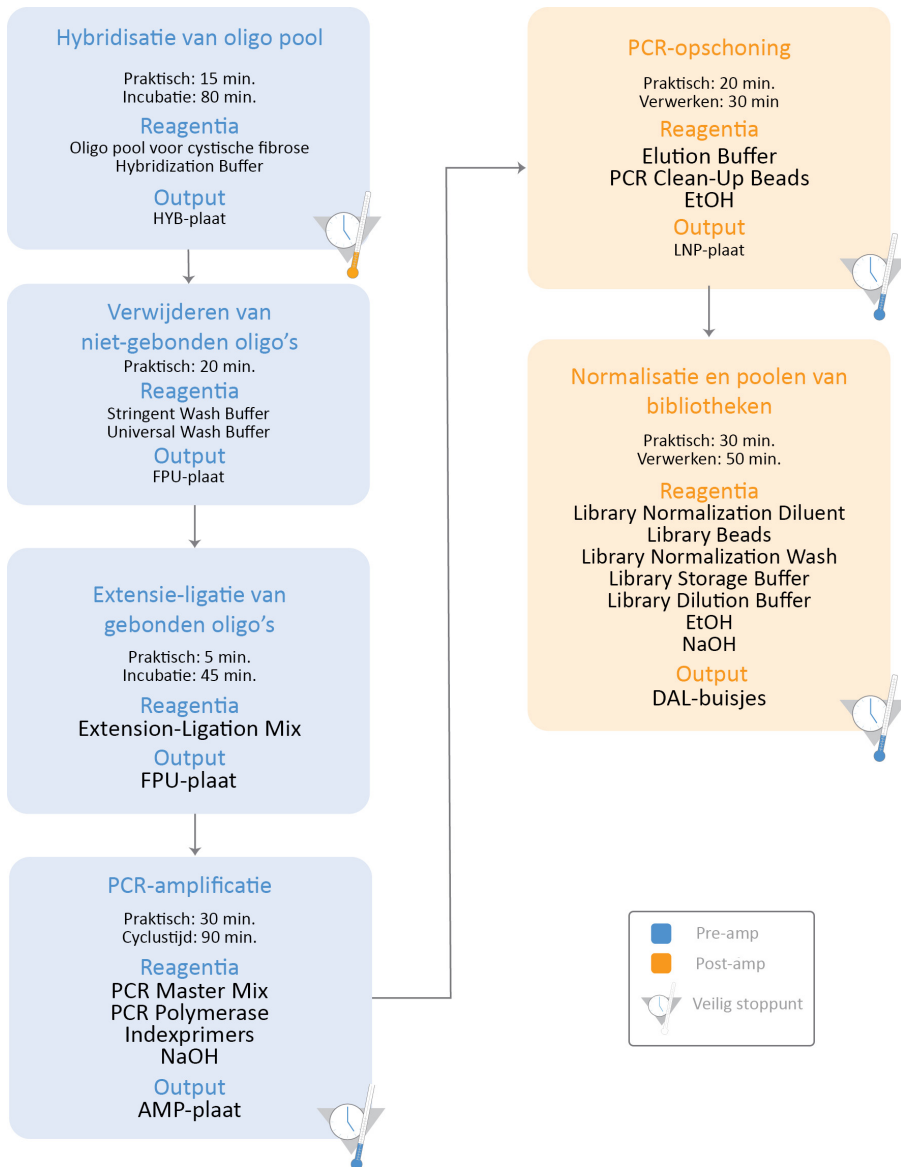
**OPMERKING** Het gebruik van minder dan 24 monsters wordt niet gevalideerd door Illumina.

## Workflow voor bibliotheekvoorbereiding

Het volgende diagram illustreert de workflow voor bibliotheekvoorbereiding voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. De pre-amplificatiestappen omvatten: Hybridisatie van oligo pool, verwijdering van niet-gebonden oligonucleotiden en extensie-ligatie van gebonden oligonucleotiden. Voor de PCR-amplificatiestap vindt de PCR-plaatinstelling plaats in het pre-amplificatiegebied, terwijl PCR op de thermocycler in het post-amplificatiegebied plaatsvindt. De post-amplificatiestappen omvatten: PCR-opschoning en bibliotheeknormalisatie en pooling.

De veilige stoppunten zijn gemarkeerd tussen de stappen.

Afbeelding 1 Workflow voor bibliotheekvoorbereiding Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay



## Gebruiksaanwijzing

De TruSight Cystic Fibrosis Library Prep ondersteunt twee assays, de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, die kunnen worden uitgevoerd met de MiSeqDx Reagent Kit v3 (24-96 monsters met de niet-micro-analysemodules) of de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (24-36 monsters met de micro-analysemodules). De TruSight Cystic Fibrosis-workflow omvat assayselectie, bibliotheekvoorbereiding, sequencing en wassing na de run. Raadpleeg de onderstaande tabel voor meer informatie over beschikbare workflows.

Assay selecteren	Doorvoer	Reagens voor sequencing	Analysemodule
Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay	24-36	MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro	CF Clinical Seq 2.0 Micro
	24-96	MiSeqDx Reagent Kit v3	CF Clinical Seq 2.0
Cystic Fibrosis 139-Variant Assay	24-36	MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro	CF 139-variant 2.0 Micro
	24-96	MiSeqDx Reagent Kit v3	CF 139-variant 2.0

## Selectie van de assay en instellen van een run

- Bij gebruik van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, raadpleeg [Gebruik van de Analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager op pagina 29](#).
  - U kunt ook deze pagina raadplegen voor instructies over het gebruik van de TruSight Cystische fibrose 139-Variant 2.0 Micro-analysemodule. Als u dit doet, moet u **CF 139-Variant 2.0 Micro** selecteren wanneer u de run aanmaakt in plaats van CF 139-Variant 2.0.
- Bij gebruik van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay, raadpleeg [Gebruik van de Analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager op pagina 31](#).
  - U kunt ook deze pagina raadplegen voor instructies over het gebruik van de TruSight Cystische fibrose Clinical Seq 2.0 Micro-analysemodule. Als u dit doet, moet u **CF Clinical Seq 2.0 Micro** selecteren wanneer u de run aanmaakt in plaats van CF Clinical Seq 2.0.

## Gebruik van de Analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager

### Parameters instellen

1. Inloggen bij de Local Run Manager.
2. Selecteer **Create Run** (Run aanmaken) en selecteer dan **CF 139-variant 2.0**.
3. Voer een runnaam in die de run van de sequencing tot en met de analyse identificeert. Gebruik alfanumerieke tekens, spaties, onderstrepingstekens of streepjes (40 tekens of minder).
4. **[Optioneel]** Voer een runbeschrijving in. Gebruik alfanumerieke tekens, spaties, onderstrepingstekens of streepjes (150 tekens of minder).
5. Voer het partijnummer en de vervaldatum van de bibliotheekvoorbereidingskit in.

### Monsters voor de run specificeren

Specificeer monsters voor de run op een van de volgende manieren:

- **Monsters handmatig invoeren:** gebruik de lege tabel in het scherm Create Run (Run aanmaken). Voorgestelde monsterputjes zijn gemarkeerd.
- **Monsterblad importeren:** navigeer naar een extern bestand met een kommagescheiden (\*.csv) indeling. In het scherm Create Run (Run aanmaken) kan een sjabloon worden gedownload.

## Monsters handmatig invoeren

1. Voer in het veld Sample Name (Monsternaam) een unieke naam voor het monster in. Gebruik alfanumerieke tekens, streepjes of onderstrepingstekens (40 tekens of minder).
2. Klik met de rechtermuisknop en selecteer positieve en negatieve controlemonsters. Een run moet ten minste één positieve en één negatieve controle bevatten om te kunnen opslaan.
3. **[Optioneel]** Voer in het tabblad sample description (Beschrijving van monster) een monsterbeschrijving in. Gebruik alfanumerieke tekens, streepjes of onderstrepingstekens (50 tekens of minder).
4. **[Optioneel]** Selecteer een Index 1-adapter in de Index 1 (i7)-vervolgkeuzelijst. Deze stap is optioneel omdat de i7- en i5-indexcombinaties automatisch worden ingevuld met een standaardindeling.
5. **[Optioneel]** Selecteer een Index 2-adapter in de Index 2 (i5)-vervolgkeuzelijst. Deze stap is optioneel omdat de i7- en i5-indexcombinaties automatisch worden ingevuld met een standaardindeling.
6. Selecteer het pictogram **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat weer te geven.
7. Selecteer **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat af te drukken als referentie voor het voorbereiden van bibliotheken.
8. **[Optioneel]** Selecteer **Export** (Exporteren) om een monsterinformatiebestand te exporteren.
9. Selecteer **Save Run** (Run opslaan).  
Als er minder dan 24 monsters zijn ingevoerd, verschijnt het venster Insufficient Sample (Onvoldoende monster). Selecteer **Proceed** (Verdergaan) om verder te gaan of selecteer **Cancel** (Annuleren) om de monsters te bewerken.



### LET OP

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 96 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina Analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager.

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 36 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina TruSight Cystische fibrose 139-Variant 2.0 Micro-analysemodule.

## Monsterblad importeren

Monsterinformatie kan uit twee typen bestanden worden geïmporteerd:

- Een bestand met monsterinformatie dat eerder met behulp van de functie Export (Exporteren) uit de Analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager is geëxporteerd.

- Een sjabloonbestand, dat kan worden gegenereerd door **Template** (Sjabloon) te selecteren in het scherm Create Run (Run aanmaken). Het sjabloonbestand bevat de juiste kolomkoppen voor importeren, met in elke kolom placeholder-informatie. Gebruik een externe editor om het sjabloonbestand aan te passen:
  1. Geef voor elk monster in de run monsterinformatie op.
  2. Verwijder alle resterende placeholder-informatie in ongebruikte cellen nadat alle monsterinformatie is opgegeven.
  3. Sla het sjabloonbestand op

Het importeren van monsterinformatie gaat als volgt:

1. Selecteer **Import Samples** (Monsters importeren) en blader dan naar het bestand en selecteer dit.
2. Selecteer het pictogram **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat weer te geven.
3. Selecteer **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat af te drukken als referentie voor het voorbereiden van bibliotheken.
4. Selecteer **Save Run** (Run opslaan).  
 Als er minder dan 24 monsters zijn ingevoerd, verschijnt het venster Insufficient Sample (Onvoldoende monster). Selecteer **Proceed** (Verdergaan) om verder te gaan of selecteer **Cancel** (Annuleren) om de monsters te bewerken.



## LET OP

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 96 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina Analysemodule CF 139-variant 2.0 in Local Run Manager. Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 36 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina TruSight Cystische fibrose 139-Variant 2.0 Micro-analysemodule.

## Een run bewerken

Voor instructies voor het bewerken van de informatie in uw run voordat u een sequencing start, raadpleeg de *Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx (documentnr. 1000000011880)*.

# Gebruik van de Analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager

## Parameters instellen

1. Inloggen bij de Local Run Manager.
2. Selecteer **Create Run** (Run aanmaken) en selecteer daarna **CF Clinical Seq 2.0**. Een bevestigingsvenster geeft de selectie weer.

3. Vink het selectievakje aan en selecteer **Confirm** (Bevestigen) om door te gaan of selecteer **Cancel** (Annuleren) om terug te keren naar het hoofdscherm.
4. Voer een runnaam in die de run van de sequencing tot en met de analyse identificeert.  
Gebruik alfanumerieke tekens, spaties, onderstrepingstekens of streepjes (40 tekens of minder).
5. **[Optioneel]** Voer een runbeschrijving in.  
Gebruik alfanumerieke tekens, spaties, onderstrepingstekens of streepjes (150 tekens of minder).
6. Voer het partijnummer en de vervaldatum van de bibliotheekvoorbereidingskit in.

## Monsters voor de run specificeren

Specificeer monsters voor de run op een van de volgende manieren:

- **Monsters handmatig invoeren:** gebruik de lege tabel in het scherm Create Run (Run aanmaken).  
Voorgestelde monsterputjes zijn gemarkeerd.
- **Monsterblad importeren:** navigeer naar een extern bestand met een kommagescheiden (\*.csv) indeling. In het scherm Create Run (Run aanmaken) kan een sjabloon worden gedownload.

## Monsters handmatig invoeren

1. Voer in het veld Sample Name (Monsternaam) een unieke naam voor het monster in.  
Gebruik alfanumerieke tekens, streepjes of onderstrepingstekens (40 tekens of minder).
2. Klik met de rechtermuisknop en selecteer positieve en negatieve controlemonsters.  
Een run moet ten minste één positieve en één negatieve controle bevatten om te kunnen opslaan.
3. **[Optioneel]** Voer in het tabblad sample description (Beschrijving van monster) een monsterbeschrijving in.  
Gebruik alfanumerieke tekens, streepjes of onderstrepingstekens (50 tekens of minder).
4. **[Optioneel]** Selecteer een Index 1-adapter in de Index 1 (i7)-vervolgkeuzelijst.  
Deze stap is optioneel omdat de i7- en i5-indexcombinaties automatisch worden ingevuld met een standaardindeling.
5. **[Optioneel]** Selecteer een Index 2-adapter in de Index 2 (i5)-vervolgkeuzelijst.  
Deze stap is optioneel omdat de i7- en i5-indexcombinaties automatisch worden ingevuld met een standaardindeling.
6. Selecteer het pictogram **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat weer te geven.
7. Selecteer **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat af te drukken als referentie voor het voorbereiden van bibliotheken.
8. **[Optioneel]** Selecteer **Export** (Exporteren) om een monsterinformatiebestand te exporteren.
9. Selecteer **Save Run** (Run opslaan).  
Als er minder dan 24 monsters zijn ingevoerd, verschijnt het venster Insufficient Sample (Onvoldoende monster). Selecteer **Proceed** (Verdergaan) om verder te gaan of selecteer **Cancel** (Annuleren) om de monsters te bewerken.



**LET OP**

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 96 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina Analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager.

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 36 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina TruSight Cystische fibrose Clinical Seq 2.0 Micro-analysemodule.

**Monsterblad importeren**

Monsterinformatie kan uit twee typen bestanden worden geïmporteerd:

- Een bestand met monsterinformatie dat eerder met behulp van de functie Export (Exporteren) uit de Analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager is geëxporteerd.
- Een sjabloonbestand, dat kan worden gegenereerd door **Template** (Sjabloon) te selecteren in het scherm Create Run (Run aanmaken). Het sjabloonbestand bevat de juiste kolomkoppen voor importeren, met in elke kolom placeholder-informatie. Gebruik een externe editor om het sjabloonbestand aan te passen:
  1. Geef voor elk monster in de run monsterinformatie op.
  2. Verwijder alle resterende placeholder-informatie in ongebruikte cellen nadat alle monsterinformatie is opgegeven.
  3. Sla het sjabloonbestand op.

Het importeren van monsterinformatie gaat als volgt:

1. Selecteer **Import Samples** (Monsters importeren) en blader dan naar het bestand en selecteer dit.
2. Selecteer het pictogram **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat weer te geven.
3. Selecteer **Print** (Afdrukken) om de indeling van de plaat af te drukken als referentie voor het voorbereiden van bibliotheken.
4. Selecteer **Save Run** (Run opslaan).

Als er minder dan 24 monsters zijn ingevoerd, verschijnt het venster Insufficient Samples (Onvoldoende monster). Selecteer **Proceed** (Verdergaan) om verder te gaan of selecteer **Cancel** (Annuleren) om de monsters te bewerken.

**LET OP**

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 96 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina Analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager.

Sequencing met poolbibliotheken die minder dan 24 monsters of meer dan 36 monsters bevatten is niet gevalideerd door de Illumina TruSight Cystische fibrose Clinical Seq 2.0 Micro-analysemodule.

## Een run bewerken

Voor instructies voor het bewerken van de informatie in uw run voordat u een sequencing start, raadpleeg de *Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx (documentnr. 1000000011880)*.

## Bibliotheekvoorbereiding

**OPMERKING** De workflow voor bibliotheekvoorbereiding voor Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay is identiek.

## Hybridisatie van oligonucleotidepool

### Verbruiksartikelen

- PCR-plaat met 96 monsterputjes
- Genomische DNA-monsters (gDNA)
- Hybridization Buffer
- Positief controlemonster
- Oligo pool voor cystische fibrose
- TE Buffer
- Zelfklevende aluminium afsluitfolie

### Vorbereiden

1. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
Hybridization Buffer	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig om ervoor te zorgen dat alle precipitaten volledig zijn opgelost en centrifugeer de buisjes vervolgens kort om vloeistof op te vangen.
Oligo pool voor cystische fibrose	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig om ervoor te zorgen dat alle precipitaten volledig zijn opgelost en centrifugeer de buisjes vervolgens kort om vloeistof op te vangen.

2. Breng de gDNA-monsters en positieve controlemonsters op kamertemperatuur.
3. Stel een verwarmingsblok met 96 putjes in op 95 °C.
4. Verwarm een incubator voor op 37 °C.

## Procedure

1. Voorzie een nieuwe PCR-plaat met 96 putjes van het label "HYB\_Plate\_ID".
2. Maak de monsterplaat volgens de plaatafbeelding die is afgedrukt via Local Run Manager.
3. Volg de plaatlay-out die door Local Run Manager is gegenereerd en voeg 5 µl negatieve controle (bijv. TE Buffer) toe aan het juiste putje van de HYB-plaat.
4. Voeg monster van 5 µl of controle bij 50 ng/µl (totaal 250 ng) toe aan de juiste putjes van de HYB-plaat.
5. Voeg 5 µl Oligo pool voor cystische fibrose toe aan elk monsterputje.
6. Voeg 40 µl Hybridization Buffer toe aan elk monster in de HYB-plaat.
7. Pipetteer voorzichtig 3 tot 5 keer op en neer om te mengen.
8. Sluit de **HYB**-plaat af en centrifugeer 1 minuut lang op 1000 × g en op 20 °C.
9. Plaats de HYB-plaat in het voorverwarmde blok op 95 °C en incubeer 1 minuut lang.
10. Verlaag de temperatuur van het verwarmingsblok tot 40 °C en ga door met incuberen totdat het verwarmingsblok 40 °C bereikt (~80 minuten). Een geleidelijke koeling is van cruciaal belang voor een goede hybridisatie.

## VEILIG STOPPUNT

Nadat het verwarmingsblok 40 °C heeft bereikt, blijft de HYB-plaat 2 uur stabiel bij 40 °C.

## Verwijderen van niet-gebonden oligonucleotiden

### Verbruiksartikelen

- Extensie-Ligation Mix
- Filterplaat
- Stringent Wash Buffer
- Universal Wash Buffer
- MIDI-plaat

## Vorbereiden

1. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
Extensie-Ligation Mix	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex om te mengen.
Stringent Wash Buffer	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig. Zorg ervoor dat alle neerslag is opgelost.
Universal Wash Buffer	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex om te mengen.

2. Monteer de filterplaatseenheid (FPU) *van boven naar beneden*:
  - Deksel
  - Filterplaat
  - Adapterring
  - MIDI-plaat
3. Was het filterplaatmembraan als volgt voor.
  - a. Voeg 45 µl Stringent Wash Buffer toe aan elk putje.
  - b. Bedek de filterplaat met het deksel en centrifugeer vervolgens 5 minuten lang op 2400 × g en op 20 °C.
4. Controleer of alle putjes van de filterplaat volledig leeglopen. Als de wasbuffer niet volledig wegloopt, centrifugeer dan opnieuw op 2400 × g en 20 °C totdat alle vloeistof is doorgelopen (5–10 minuten extra).



### LET OP

Het is van cruciaal belang om de centrifugetemperatuur tijdens de wasstappen te beheersen. Zorg ervoor dat de centrifuge vóór elk gebruik is voorgekoeld tot 20 °C. Als de temperatuur 25 °C of hoger bereikt, kan de hogere temperatuur leiden tot een krachtigere binding van de primer. In zeldzame gevallen, als monsters SNV's hebben in primerbindingsregio's, kan de hogere krachtigheid leiden tot alleldrop-out.

## Procedure

1. Haal de HYB-plaat uit het verwarmingsblok en centrifugeer 1 minuut lang op 1000 × g en 20 °C.
2. Gebruik een meerkanaalspipet ingesteld op 55 µl en breng het volledige volume van elk monster over naar de overeenkomstige putjes in de filterplaat.
3. Bedek de filterplaat met het deksel en centrifugeer vervolgens 5 minuten lang op 2400 × g en op 20 °C.
4. Was de filterplaat als volgt.
  - a. Voeg 45 µl Stringent Wash Buffer toe aan elk monsterputje.
  - b. Bedek de filterplaat met het deksel en centrifugeer vervolgens 5 minuten lang op 2400 × g en op 20 °C.

5. Was de plaat een **tweede** keer.
6. Als de wasbuffer niet volledig wegloopt, centrifugeer dan opnieuw op 2400 × g en 20 °C totdat alle vloeistof is weggelopen (5–10 minuten extra).
7. Gooi alle doorgelopen vloeistof weg en zet de FPU weer in elkaar.
8. Voeg 45 µl Universal Wash Buffer toe aan elk monsterputje.
9. Bedek de filterplaat met het deksel en centrifugeer vervolgens 10 minuten lang op 2400 × g en op 20 °C.
10. Zorg ervoor dat alle vloeistof is weggelopen na het centrifugeren. Centrifugeer zo nodig opnieuw.

## Extensie-ligatie van gebonden oligonucleotiden

### Verbruiksartikelen

- Extensie-Ligation Mix
- Zelfklevende aluminium afsluitfolie

### Procedure

1. Voeg 45 µl Extensie-Ligation Mix toe aan elke monsterputje van de filterplaat.
2. Sluit de filterplaat af en bedek deze met de deksel.
3. Incubeer de **FPU** gedurende 45 minuten in de op 37 °C voorverwarmde incubator.
4. Terwijl de **FPU**-plaat wordt geïncubeerd, bereidt u de AMP (amplificatieplaat) voor zoals beschreven in het volgende gedeelte.

## PCR-amplificatie

### Verbruiksartikelen

- PCR-plaat met 96 monsterputjes
- PCR-plaatafsluiting
- Indexprimers (A501–A508 en A701–A712)
- 10 N NaOH
- PCR Master Mix
- PCR Polymerase
- Conisch buisje van 15 ml

### Voorbereiden

1. Bepaal de te gebruiken indexprimers op basis van de grafische plaatlay-out in Local Run Manager.
2. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
Indexprimers (A501–A508 en A701–A712)	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex om te mengen, daarna kort centrifugeren.
PCR Polymerase	-25 °C tot -15 °C	Laat het mengsel in de vriezer totdat het nodig is om de PCR-werkoplossing te bereiden.
PCR Master Mix	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex om te mengen, daarna kort centrifugeren.

3. Bereid vers 0,05 N NaOH door 25 µl 10 N NaOH toe te voegen aan 4975 µl RNase/DNase-free water.
4. Voorzie een nieuwe PCR-plaat met 96 putjes van het label 'AMP'.
5. Voeg als volgt indexprimers toe aan de AMP-plaat.
  - a. Voeg 4 µl van de geselecteerde Index 2-primers (A501–A508) toe aan het juiste putje in de AMP-plaat.
  - b. Gooi de originele witte doppen weg en breng vervolgens nieuwe witte doppen aan.
  - c. Voeg 4 µl van de geselecteerde Index 1-primers (A701–A712) toe aan de juiste rij van de AMP-plaat.
  - d. Gooi de originele oranje doppen weg en breng vervolgens nieuwe oranje doppen aan.
6. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
PCR Polymerase	-25 °C tot -15 °C	Uit de opslag nemen en kort centrifugeren. Ga direct door naar de volgende stap. Als er PCR polymerase wordt gebruikt voor aanvullende preparaten, retourneer de PCR-werkoplossing dan naar de opslag nadat deze is gemaakt.

7. Bereid de PCR-werkoplossing als volgt voor.

**OPMERKING** De onderstaande instructies vermelden de volumes die nodig zijn om 96 monsters te verwerken. Als er minder monsters worden verwerkt, past u de volumes dienovereenkomstig aan om reagentia te besparen.

- a. Voeg voor 96 monsters 56 µl PCR Polymerase toe aan 2,8 ml PCR Master Mix.
  - b. Keer de oplossing 20 keer om om deze te mengen.
- De PCR-werkoplossing is gedurende 10 minuten stabiel bij kamertemperatuur.

## Procedure

1. Verwijder de FPU uit de incubator en verwijder vervolgens de afsluiting.
2. Bedek de filterplaat met het deksel en centrifugeer vervolgens 2 minuten lang op 2400 × g en op 20 °C.
3. Voeg 25 µl 0,05 N NaOH toe aan elk putje op de filterplaat.
4. Pipetteer 5–6 keer op en neer.

5. Bedek de filterplaat met het deksel en incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
6. Breng, terwijl de filterplaat aan het incuberen is, 22 µl PCR Master Mix over naar elk putje van de AMP-plaat die indexprimers bevat.
7. Breng als volgt de van het filter geëluëerde monsters over naar de AMP-plaat.
  - a. Pipetteer de monsters in de eerste kolom van de filterplaat 5–6 keer op en neer.
  - b. Breng 20 µl van de filterplaat over naar de overeenkomstige kolom van de AMP-plaat.
  - c. Pipetteer 5–6 keer voorzichtig op en neer om het DNA grondig te combineren met het PCR Master Mix.
  - d. Herhaal de stappen voor overbrenging van de filterplaat naar de AMP-plaat voor de resterende kolommen.
8. Sluit de AMP-plaat af en zet deze vast met een rubberen roller.
9. Centrifugeer 1 minuut lang op 1000 x g en op 20 °C.
10. Breng de AMP-plaat over naar het post-amplificatiegebied.
11. Voer PCR uit met behulp van het volgende programma op een thermocycler:
  - 3 minuten lang op 95 °C
  - 25 cycli van:
    - 95 °C gedurende 30 seconden
    - 62 °C gedurende 30 seconden
    - 72 °C gedurende 60 seconden
  - 72 °C gedurende 5 minuten
  - Vasthouden op 10 °C

## VEILIG STOPPUNT

Als u niet onmiddellijk overgaat tot PCR-opschoning, kan de AMP-plaat 's nachts op de thermocycler blijven of tot 48 uur op een temperatuur van 2 °C tot 8 °C worden bewaard.

## PCR-opschoning

### Verbruiksartikelen

- Conisch buisje van 50 ml
- Zelfklevende plaatafsluitingen voor eenmalig gebruik
- Twee MIDI-platen
- Elution Buffer
- PCR Clean-Up Beads

### Voorbereiden

1. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
PCR Clean-Up Beads	2 °C tot 8 °C	Laat 30 minuten staan om op kamertemperatuur te komen.

- Voor 96 monsters bereidt u verse 80% EtOH voor met 36 mL absolute EtOH en 9 mL DNase/RNase-free water. Grondig mengen.

**OPMERKING** Als er minder dan 96 monsters worden verwerkt, past u de volumes dienovereenkomstig aan om reagentia te besparen.

## Procedure

- Centrifugeer de AMP-plaat 1 minuut lang op 1000 x g en op 20 °C.
- Label een nieuwe MIDI-plaat "**CLP\_Plate\_ID**" (Clean-up Plate).
- PCR Clean-Up Beads 10 keer omkeren. Vortex krachtig en keer dan nog eens 10 keer om. Voer een visuele inspectie van de oplossing uit om er zeker van te zijn dat de parels zijn geresuspendeerd.
- Voeg 45 µl PCR Clean-Up Beads toe aan elk putje van de CLP-plaat.
- Breng het gehele PCR-product van elk putje vanaf de AMP-plaat over naar het overeenkomstige putje op de CLP-plaat.
- Sluit af en schud gedurende 2 minuten op een microplaatschudapparaat bij 1800 tpm.
- Incubeer gedurende 10 minuten op kamertemperatuur zonder te schudden.
- Plaats de plaat op de magnetische standaard en wacht tot de vloeistof helder is (~2 minuten).
- Terwijl de CLP-plaat zich op de magnetische standaard bevindt, verwijdert u het supernatant voorzichtig en gooit u dit weg.
- Was de parels als volgt.
  - Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse EtOH van 80% toe aan elk putje.
  - Wacht minimaal 30 seconden of totdat het supernatant helder is.
  - Verwijder al het supernatant uit de putjes en gooi dit weg.
- Was de parels een **tweede** keer.
- Gebruik een P20 meerkanaalspipet ingesteld op 20 µl om overtollige EtOH te verwijderen.
- Verwijder de CLP-plaat van de magnetische standaard en laat de parels 10 minuten aan de lucht drogen.
- Voeg 30 µl Elution Buffer toe aan elk monster.
- Sluit de CLP-plaat af en schud gedurende 2 minuten op een microplaatschudapparaat bij 1800 tpm. Controleer na het schudden of de monsters zijn geresuspendeerd. Zo niet, herhaal deze stap dan.
- Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
- Plaats de CLP-plaat op de magnetische standaard en wacht tot het supernatant helder is (~2 minuten).
- Voorzie een nieuwe MIDI-plaat van het label 'LNP'.



19. Breng 20 µl supernatant vanuit elk putje van de CLP-plaat over naar het overeenkomstige putje van de LNP-plaat.
20. **[Optioneel]** Breng het resterende 10 µl supernatant vanaf de CLP-plaat over naar een nieuwe plaat en label deze plaat met de runnaam en -datum. Bewaar deze plaat bij -25 °C tot -15 °C tot voltooiing van de sequencing-run en gegevensanalyse. De opgeschoonde PCR-producten kunnen worden gebruikt voor het oplossen van problemen in het geval van monsterfouten.

## VEILIG STOPPUNT

Als u op dit punt stopt, sluit u de LNP-plaat af en centrifugeert u gedurende 1 minuut op 1000 × g en 20 °C. De plaat blijft tot 3 uur stabiel op een temperatuur van 2 °C tot 8 °C.

## Normalisatie en poolen van bibliotheken

### Verbruiksartikelen

- Conisch buisje van 15 ml
- PCR-plaat met 96 monsterputjes
- Buisjes voor microcentrifuge
- Library Beads
- Library Dilution Buffer
- Library Normalization Diluent
- Library Normalization Wash
- 10 N NaOH
- RNase/DNase-free water

### Voorbereiden

1. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
Library Beads	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.
Library Dilution Buffer	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig. Zorg ervoor dat alle neerslag is opgelost.
Library Normalization Diluent	-25 °C tot -15 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig. Zorg ervoor dat alle neerslag is opgelost.
Library Normalization Wash	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur. Vortex krachtig.

2. Bereid verse 0,1 N NaOH voor door 50 µl 10 N NaOH toe te voegen aan 4950 µl RNase/DNase-free water.

## Procedure

1. Meng Library Normalization Diluent en Library Beads in een vers 15 ml conisch buisje als volgt.

**OPMERKING** De onderstaande instructies vermelden de volumes die nodig zijn om 96 monsters te verwerken. Als er minder monsters worden verwerkt, past u de volumes dienovereenkomstig aan om reagentia te besparen. Volumes moeten worden aangepast voor maximaal 36 monsters bij het voorbereiden van bibliotheken voor gebruik met MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro en Micro Analysis Modules.

- a. Voeg voor 96 monsters 4,4 ml Library Normalization Diluent toe.
- b. Vortex Library Beads krachtig gedurende 1 minuut onder regelmatig omkeren totdat de parels zijn geresuspendeerd en er geen pellet op de bodem van het buisje wordt gevonden als het buisje wordt omgekeerd.
- c. Pipetteer Library Beads 10 keer op en neer om te resuspenderen.



### LET OP

Het is zeer belangrijk om de bibliotheekparelpellet onderin het buisje volledig te resuspenderen. Het gebruik van een P1000 zorgt ervoor dat de parels homogeen worden geresuspendeerd en dat er geen parelmasse onderin het buisje aanwezig is. Dit is essentieel voor het bereiken van een consistente clusterdichtheid op de stroomcel.

- d. Pipetteer voor 96 monsters 800 µl Library Beads naar het conische buisje met Library Normalization Diluent.
  - e. Meng het geheel door het buisje 15 tot 20 keer om te keren.
2. Voeg 45 µl Library Normalization Diluent/Library Beads-werkoplossing toe aan elk putje van de LNP-plaat.
  3. Sluit af en schud gedurende 30 minuten op een microplaatschudapparaat bij 1800 tpm.

**OPMERKING** Als u op dezelfde dag verdergaat met sequencen, begin dan met het ontdooien van de reagenscartridge. Volg de instructies voor het ontdooien van de MiSeqDx-reagenscartridge in het gedeelte [Voorbereiden op sequencing op pagina 44](#).

4. Plaats de LNP-plaat op de magnetische standaard en wacht tot de vloeistof helder is (~2 minuten).
5. Terwijl de LNP-plaat zich op de magnetische standaard bevindt, verwijdert u het supernatant voorzichtig en gooit u dit weg.
6. Verwijder de LNP-plaat van de magnetische standaard en was de parels als volgt met Library Normalization Wash:
  - a. Voeg 45 µl Library Normalization Wash toe aan elk monsterputje.

- b. Sluit de LNP-plaat af en schud gedurende 5 minuten op een microplaatschudapparaat bij 1800 tpm.
  - c. Plaats de plaat minimaal 2 minuten op de magnetische standaard of totdat het supernatant helder is.
  - d. Verwijder het supernatant voorzichtig en gooi dit weg.
7. Herhaal de procedure voor Library Normalization Wash zoals beschreven in de vorige stap.
  8. Gebruik een P20 meerkanaalspipet ingesteld op 20 µl om overtollige Library Normalization Wash te verwijderen.
  9. Verwijder de LNP-plaat van de magnetische standaard en voeg daarna 30 µl 0,1 N NaOH toe aan elk putje.
  10. Sluit de LNP-plaat af en schud gedurende 5 minuten op een microplaatschudapparaat bij 1800 tpm.
  11. Voorzie tijdens de elutie van 5 minuten een nieuwe PCR-plaat met 96 putjes van het label 'SGP'.
  12. Voeg 30 µl Library Storage Buffer toe aan elk putje.
  13. Zorg ervoor dat alle monsters in de LNP-plaat volledig zijn geresuspendeerd. Als de monsters niet volledig zijn geresuspendeerd, pipetteert u de monsters voorzichtig op en neer of tikt u zachtjes met de plaat op de bank en schudt u nog eens 5 minuten.
  14. Plaats de LNP-plaat minimaal 2 minuten op de magnetische standaard.
  15. Gebruik een meerkanaalspipet ingesteld op 30 µl en breng het supernatant van de LNP-plaat over naar de SGP-plaat. Pipetteer voorzichtig 5 keer op en neer om te mengen.
  16. Sluit de SGP-plaat af en centrifugeer 1 minuut lang op 1000 x g en op 20 °C.
  17. Vortex de bibliotheekverdunningsbuffer en zorg ervoor dat alle precipitaten volledig zijn opgelost. Centrifugeer kort om de inhoud te verzamelen.
  18. Voorzie een nieuw microcentrifugebuisje van het label 'PAL'.
  19. Bepaal de monsters die moeten worden gepoold voor sequencing. Er kunnen maximaal 96 monsters worden samengevoegd voor sequencing met behulp van de MiSeqDx Reagent Kit v3 en niet-micro-analysemodules. Er kunnen maximaal 36 monsters worden samengevoegd voor sequencing met behulp van de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro met micro-analysemodules.
  20. Breng 5 µl van elke bibliotheek die moet worden gesequenced vanuit elk putje van de SGP-plaat kolom voor kolom over naar het overeenkomstige putje van de PCR-strip met acht buisjes.
  21. Breng de inhoud van de PCR-strip met acht buisjes over naar het PAL-buisje. Vortex het PAL-buisje totdat de inhoud volledig is gemengd.
  22. Sluit de SGP-plaat af met een zelfklevende plaatafdichting en label deze met de runnaam en -datum.

**OPMERKING** De SGP-plaat kan maximaal 3 dagen tussen de -25 °C en -15 °C worden bewaard en indien nodig worden gebruikt om bibliotheken opnieuw te poolen.

23. Voorzie 2–3 nieuwe microcentrifugebuisjes van het label 'DAL'.
24. Voeg 585 µl bibliotheekverdunningsbuffer toe aan de DAL-buisjes.
25. Breng 9 µl PAL over naar elk DAL-buisje met bibliotheekverdunningsbuffer.
26. Pipetteer 3–5 keer op en neer om de tip te spoelen en ervoor te zorgen dat de overdracht volledig is.

**VEILIG STOPPUNT**

Als u niet onmiddellijk overgaat tot sequencing op de MiSeqDx, kunnen de DAL-buisjes maximaal 28 dagen worden bewaard op een temperatuur van -25 °C tot -15 °C.

# Sequencing

## Voorbereiden op sequencing

**Verbruiksartikelen**

- MiSeqDx Reagent Kit v3 of MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro
- Library Dilution Buffer
- PhiX Internal Control Bibliotheek

**Voorbereiden**

1. Stel een verwarmingsblok geschikt voor centrifugebuisjes van 1,5 ml in op 96 °C.
2. Bereid een ijswaterbad voor in een ijsemmer.
3. Bereid de volgende verbruiksartikelen voor:

Reagens	Opslag	Instructies
Library Dilution Buffer	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. Vortex om te mengen. Zorg ervoor dat alle neerslag is opgelost. Kort centrifugeren en in het ijswaterbad plaatsen. Aanvullende Library Dilution Buffer wordt geleverd bij de MiSeqDx Reagent Kit v3 of de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro, indien nodig.
PhiX Internal Control Bibliotheek	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien op kamertemperatuur. In ijswaterbad plaatsen.
Cartridge voor MiSeqDx Reagent Kit v3 of MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro	-25 °C tot -15 °C	Laat de reagenscartridge in het waterbad op kamertemperatuur ongeveer 90 minuten ontdooien of totdat deze volledig is ontdooid. Voor meer informatie over de voorbereiding van de reagenscartridge, raadpleeg Referentiehandleiding MiSeqDx-instrument voor MOS v2 (documentnr. 1000000021961).

Reagens	Opslag	Instructies
MiSeqDx Flow Cell	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur. Voor meer informatie over het voorbereiden van flowcellen, raadpleeg Referentiehandleiding MiSeqDx-instrument voor MOS v2 (documentnr. 1000000021961).
MiSeqDx SBS Solution(PR2)	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur. Voor meer informatie over het voorbereiden van SBS-oplossing, raadpleeg Referentiehandleiding MiSeqDx-instrument voor MOS v2 (documentnr. 1000000021961).

## Denatureren en verdunnen PhiX Internal Control Bibliotheek

### Verbruiksartikelen

- DNase/RNase-vrij water
- 10 N NaOH
- Library Dilution Buffer
- PhiX Internal Control Bibliotheek
- TE buffer
- Conisch buisje van 15 ml
- Buisjes voor microcentrifuge

### Voorbereiden

1. Combineer de volgende volumes om 0,1 N NaOH in een conisch buisje voor te bereiden:
  - DNase/RNase-vrij water (2475 µl)
  - Voorraad 10 N NaOH (25 µl)
2. Keer het buisje meerdere keren om, om de inhoud te mengen.



#### LET OP

Het gebruik van verse verdunde NaOH is essentieel om monsters volledig te denatureren voor de vorming van clusters op de MiSeqDx.

Als PhiX op dezelfde dag als de bibliotheeknormalisatie wordt bereid, kan dezelfde voorraad 0,1 N NaOH worden gebruikt.

3. Combineer de volgende volumes om de PhiX Internal Control Bibliotheek te verdunnen tot 2 nM:
  - 10 nM PhiX Internal Control Bibliotheek (2 µl)
  - 1X TE Buffer (8 µl)
4. Combineer de volgende volumes voor bereiding van een 1 nM PhiX Internal Control Bibliotheek:

- 2 nM PhiX Internal Control Bibliotheek (10 µl)
  - 0,1 N NaOH (10 µl)
5. Vortex kort om te mengen.
  6. Centrifugeer de 1 nM PhiX Internal Control gedurende 1 minuut op 280 × g en 20 °C.
  7. Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur om de PhiX Internal Control bibliotheekoplossing tot enkele strengen te denatureren.
  8. Combineer de volgende volumes in een nieuw microcentrifugebuisje om een PhiX Internal Control bibliotheek van 20 nM voor te bereiden:
    - Gedenatureerd PhiX Internal Control Bibliotheek (2 µl)
    - Voorgekoeld Library Dilution Buffer (98 µl)



## LET OP

De gedenatureerde 20 pM PhiX Internal Control Bibliotheek kan tot 3 weken op een temperatuur van -25 °C tot -15 °C worden bewaard als aliquots voor eenmalig gebruik.

## Monsters voorbereiden voor sequencing

1. Ga verder met één DAL-buisje voor sequencing.
2. Als het DAL-buisje in bevroren toestand was opgeslagen, ontdooit u het volledig en mengt u de oplossing door deze op en neer te pipetteren.
3. Als 20 pM PhiX Internal Control Bibliotheek in bevroren toestand was opgeslagen, verwijdert u de aliquot voor eenmalig gebruik, ontdooit u de oplossing volledig, mengt u deze door te vortexen en daarna kort te centrifugeren.
4. Voeg 6 µl 20 pM PhiX Internal Control Bibliotheek toe aan het DAL-buisje.
5. Pipetteer 3–5 keer op en neer om de tip te spoelen en ervoor te zorgen dat de overbrenging volledig is.
6. Meng de inhoud van het DAL-buisje door het buisje op topsnelheid te vortexen.
7. Centrifugeer het DAL-buisje 1 minuut lang bij 1000 x g en bij 20 °C.
8. Incubeer het DAL-buisje 2 minuten lang in een verwarmingsblok op 96 °C.
9. Keer het DAL-buisje na de incubatie 1–2 keer om om de vloeistof te mengen en plaats deze daarna onmiddellijk in het ijswaterbad.
10. Houd het DAL-buisje (gepoolde bibliotheken) 5 minuten lang in het ijswaterbad.

## Gepoolde bibliotheken op cartridge laden

1. Gebruik een nieuwe pipettip van 1 ml om de folieafdekking over het reservoir op de reagenscartridge met het label Load Samples (Laadmonsters) te doorboren.
2. Pipetteer 600µl van het DAL -buisje in het Load Samples-reservoir. Raak de folieafdekking niet aan.

- Controleer reservoir na het laden van de monsters op luchtbellen. Als er luchtbellen aanwezig zijn, tikt u zachtjes met de cartridge op de bank om de luchtbellen te verwijderen.
- Ga direct naar de stappen voor het instellen van een run via de interface van de MiSeq-besturingssoftware (MOS). Voor meer informatie over het instellen van de run op de MiSeqDx, raadpleeg de *Referentiehandleiding MiSeqDx-instrument voor MOS v2 (documentnr. 1000000021961)*.

## Wassing na de run met sjabloonlijnwassing

Na sequencing wordt het ten zeerste aanbevolen om een wassing na de run uit te voeren met een sjabloonlijnwassing.



### LET OP

Als er geen sjabloonlijnwassing wordt uitgevoerd, kunnen negatieve controlebepalingspercentages worden beïnvloed tijdens de volgende run.

**OPMERKING** De wasworkflow na de run is identiek voor Cystic Fibrosis 139-Variant Assay en Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.

### Verbruiksartikelen

- Buisjes voor microcentrifuge
- Water van laboratoriumkwaliteit
- Tween 20
- 5% natriumhypochloriet
- MiSeq-buisje

### WAARSCHUWING

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

## Voorbereiden

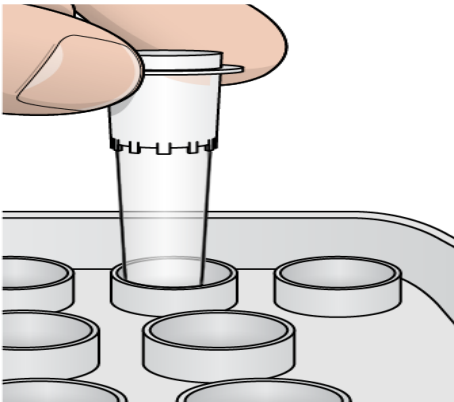
- Bereid als volgt verse wasoplossing voor met Tween 20 en water van laboratoriumkwaliteit.
  - Voeg 5 ml 100% Tween 20 toe aan 45 ml water van laboratoriumkwaliteit. Deze volumes resulteren in 10% Tween 20.

- b. Voeg 25 ml 10% Tween 20 toe aan 475 ml water van laboratoriumkwaliteit. Deze volumes resulteren in 0,5% Tween 20 wasoplossing.
    - c. Keer vijf keer om om te mengen.
  2. Bereid als volgt verse natriumhypochloriet-wasoplossing met water van laboratoriumkwaliteit voor.
    - a. Voeg 36  $\mu$ l 5% natriumhypochloriet toe aan 864  $\mu$ l water van laboratoriumkwaliteit. Deze volumes resulteren in een 1:25 natriumhypochlorietverduunning.
    - b. Voeg 50  $\mu$ l 1:25 natriumhypochlorietverduunning toe aan 950  $\mu$ l water van laboratoriumkwaliteit in een MiSeq-buisje.
  3. Het is belangrijk om de juiste concentratie natriumhypochloriet te gebruiken. Controleer het percentage natriumhypochloriet op het productetiket. Als de concentratie te hoog is, kan het genereren van clusters in volgende runs mislukken. Als er geen 5% natriumhypochloriet beschikbaar is, bereid dan een 1 ml oplossing van 0,01% natriumhypochloriet voor in water van laboratoriumkwaliteit. Gebruik geen natriumhypochloriet bij een onderhoudswasbeurt of een stand-by wasbeurt.
  4. Bereid de wascomponenten als volgt voor met verse wasoplossing.
    - a. Voeg 6 ml wasoplossing toe aan elk reservoir van de wasbak.
    - b. Voeg 350 ml wasoplossing toe aan de wasfles van 500 ml.

## Procedure

1. Plaats het MiSeq -buisje met de 0,01% natriumhypochloriet wasoplossing in positie 17 van de wasbak. Zorg ervoor dat de hals van het buisje gelijk ligt met de bak.  
Het buisje verplaatst de wasoplossing met Tween 20 en water van laboratoriumkwaliteit vanuit positie 17.

Afbeelding 2 MiSeq-buisje in positie 17 van de wasbak



### LET OP

Zorg ervoor dat het MiSeq-buisje met natriumhypochloriet alleen in bakpositie 17 wordt geplaatst. Als het buisje in een andere positie wordt geplaatst, kan de vorming van clusters in daaropvolgende runs mislukken.



2. Wanneer de run is voltooid, selecteert u **Start Wash** (Wassing starten).  
De software beweegt automatisch de zuigmondjes in de reagenskoeler omhoog.
3. Selecteer **Perform optional template line wash** (Optionele sjabloonlijnwasning uitvoeren) op het scherm Post-Run Wash (Wassing na de run).
4. Open de deur van het reagenscompartiment en de reagenskoeler en schuif de gebruikte reagenscartridge uit de koeler.
5. Schuif de wasbak in de reagenskoeler totdat deze stopt en sluit daarna de deur van de reagenskoeler.
6. Beweeg de zuigmondjeshendel vóór de MiSeqDx SBS Solution-fles en de afvalfles omhoog totdat deze op zijn plaats vastklikt.
7. Verwijder de MiSeqDx SBS Solution-fles en vervang deze door de wasfles.
8. Verwijder de afvalfles en gooi de inhoud ervan op de juiste wijze weg. Plaats de afvalfles terug in het reagenscompartiment.
9. Beweeg de hendel van het zuigmondje langzaam omlaag. Zorg ervoor dat de zuigmondjes in de wasfles en afvalfles zakken.
10. Sluit de klep van het reagenscompartiment.
11. Selecteer **Next** (Volgende). De wassing na de run begint.
12. Nadat de wasbeurt is voltooid, laat u de gebruikte stroomcel, wasbak en wasfles met de resterende wasoplossing op het instrument.
13. De zuigmondjes blijven in de neergedaalde positie, wat normaal is. Laat de ongebruikte wasoplossing in de wasbak en wasfles om te voorkomen dat de zuigmondjes uitdrogen en er lucht in het systeem terechtkomt.

## Heranalyse van gesequencede bibliotheken

Na een sequencing-run, kan een heranalyse van dezelfde sequencing-gegevensset worden uitgevoerd door de procedure *Requeue Analysis* (Analyse opnieuw in de wachtrij plaatsen) in de *Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx* (documentnr. 1000000011880) te volgen. Het opnieuw in de wachtrij plaatsen van de analyse is beperkt tot de module die oorspronkelijk werd gebruikt om de sequencing uit te voeren. Door de analyse opnieuw in de wachtrij te plaatsen, kunnen bewerkingen van monstergegevens worden uitgevoerd en nieuwe rapporten worden gegenereerd.

**OPMERKING** Gepoolde bibliotheken die voor sequencing worden gebruikt, moeten 24-96 monsters bevatten bij gebruik van de MiSeqDx Reagent Kit v3, of 24-36 monsters bij gebruik van de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Rapporten voor een subset van monsters kunnen worden verkregen door minder monsters in te voeren tijdens het instellen van de wachtrij. Rapporten worden alleen gegenereerd voor monsters die zijn ingevoerd tijdens het instellen van de wachtrij.

# Opties voor het opnieuw testen van gepoolde bibliotheken

De TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay gebruikt dezelfde workflow en reagentia voor bibliotheekvoorbereiding als de TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. De procedure voor de bibliotheekvoorbereiding vereist de selectie van een assay voordat u begint. In gevallen waarin gepoolde bibliotheken (DAL-buisjes) echter aanvullende tests vereisen (bijvoorbeeld het herhalen van een sequencing-run of reflextesten met een andere TruSight CF-assay), kunnen DAL-buisjes naar behoefte worden gebruikt zonder de bibliotheekvoorbereiding te herhalen. Volg de onderstaande procedure voor opnieuw testen:

1. Stel de run in aan de hand van de instructies in [Selectie van de assay en instellen van een run op pagina 29](#).
2. Sequence bibliotheken door de instructies in [Sequencing op pagina 44](#) te volgen.
3. Nadat de sequencing-run is voltooid, wast u de MiSeqDx volgens de instructies in [Wassing na de run met sjabloonlijnwassing op pagina 47](#).

**OPMERKING** Gepoolde bibliotheken die voor sequencing worden gebruikt, moeten ten minste 24–96 monsters bevatten bij gebruik van de MiSeqDx Reagent Kit v3 of 24–36 monsters bij gebruik van de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Rapporten voor een subset van monsters kunnen worden verkregen door minder monsters in te voeren tijdens het instellen van de sequencing-run. Alle gepoolde monsters worden gesequencet, maar er worden alleen rapporten gegenereerd voor monsters die zijn ingevoerd tijdens het instellen van de sequencing-run.

## Interpretatie van de resultaten voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

- De Cystic Fibrosis 139-Variant Assay is bedoeld om 139 CFTR-varianten te detecteren, waaronder de varianten die zijn aanbevolen door het ACMG ([Tabel 2](#)).
- Het assayrapport vermeldt de monsternamen en het genotype voor elke variant die voor een monster is gedetecteerd.
  - Alle monsters worden onderzocht op 134 CF-veroorzakende varianten en de door het ACMG aanbevolen R117H-variant. Alleen gedetecteerde mutante allelen worden in het assayrapport vermeld.
  - De PolyTG/PolyT-variant wordt alleen gerapporteerd als de R117H-variant voor een monster wordt geïdentificeerd. Bij patiënten met een R117H-variant moeten aanvullende tests worden uitgevoerd om te bepalen of een PolyTG/PolyT-variant, die het klinische fenotype (bijv. 12-13 [TG] of 5T) kan beïnvloeden, zich in een cis/trans-oriëntatie bevindt ten opzichte van de R117H-variant.

**OPMERKING** Het PolyTG/PolyT-genotype wordt door de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay bepaald op basis van het lezen en tellen van de meest voorkomende genotypen. Vanwege de digitale aard van next-generation sequencing kan de assay een hoge nauwkeurigheid bereiken vanuit meerdere waarnemingen. Andere op sequencing gebaseerde technologieën gebruiken slechts een paar waarnemingen.

- Als een monster het homozygoot F508del- of I507del-genotype heeft en een of meer van de drie goedaardige polymorfismen I506V, I507V en F508C worden gedetecteerd, wordt dit voor het monster gerapporteerd. Als alle drie goedaardige polymorfismen wild-type zijn, geeft het rapport aan dat de I506V-, I507V- en F508C-varianten niet aanwezig zijn in het monster.

**OPMERKING** Omdat de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay een op sequencing gebaseerde assay is, is er geen interferentie met de rapportage van F508del of I507del als gevolg van de drie goedaardige polymorfismen. Daarom worden er geen correcties aangebracht in het gedetecteerde resultaat.

- Als een monster wordt geïdentificeerd als heterozygoot en zowel wild-type als mutante allelen worden gedetecteerd voor het monster, wordt het genotyperingsresultaat gerapporteerd als HET.
- Als een monster wordt geïdentificeerd als homozygoot en alleen het mutante allel voor het monster wordt gedetecteerd, wordt het genotyperingsresultaat gerapporteerd als HOM.
- Als er geen variant voor een monster wordt geïdentificeerd, geeft het rapport aan dat er geen panelvarianten zijn gedetecteerd.
- Het assayrapport biedt informatie over het bepalingspercentage voor elk monster. Het bepalingspercentage wordt berekend als het aantal variantposities/-regio's dat voldoet aan een vooraf gedefinieerde betrouwbaarheidsdrempel, gedeeld door het totale aantal onderzochte variantposities/-regio's.
  - Voor monsters die voorwaardelijk moeten worden gerapporteerd, worden de aanvullende onderzochte varianten ook meegenomen in de berekening van het bepalingspercentage.
  - Elke variant met een vooraf gedefinieerde betrouwbaarheidswaarde onder de drempel wordt gerapporteerd als een niet-bepaling. Het wordt aanbevolen dat u het monster opnieuw test.
- Een monsterresultaat wordt alleen als geldig beschouwd als het bepalingspercentage  $\geq 99\%$  is. Als het bepalingspercentage  $< 99\%$  is, wordt de prestatie gerapporteerd als Fail (Mislukt) en moet het monster opnieuw worden getest.



## LET OP

Als het bepalingspercentage  $< 50\%$  is, wordt de prestatie gerapporteerd als Fail (Mislukt) en wordt de opmerking Sample Failed (Monster mislukt) aangegeven op het rapport. Er worden geen variantgegevens weergegeven. Dit monster moet opnieuw worden getest.

- Het wordt aanbevolen om varianten die zijn gevalideerd met synthetische monsters (zie [Nauwkeurigheid op pagina 55](#)) door de gebruiker te laten verifiëren met behulp van een gevalideerde referentiemethode voordat het eerste patiëntresultaat met die varianten wordt gerapporteerd
- Als voor een monster meer dan twee varianten worden geïdentificeerd, wordt aanbevolen dat de gebruiker het resultaat verifieert door het monster opnieuw te analyseren met behulp van de TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay met een vers gDNA-extract om kruisbesmetting van het monster uit te sluiten.

**OPMERKING** Als er twee of meer varianten worden gedetecteerd, moet haplotype-fasering worden overwogen.

- Alle variantinterpretaties moeten worden uitgevoerd door een gecertificeerde klinisch moleculair geneticus of gelijkwaardig volgens lokale procedures en richtlijnen.<sup>15</sup> Mogelijke interpretatiereferenties omvatten, maar zijn niet beperkt tot: CFTR2 database,<sup>11</sup> Sosnay paper,<sup>13</sup> ACMG richtlijnen uit 2004,<sup>1</sup> en advies van de ACOG commissie uit 2011.<sup>2</sup> Voor informatie over hoe resultaten worden berekend en gepresenteerd of voor een beschrijving van de inhoud in een tekstbestandsrapport, zie de handleidingen voor de analysesoftware die bij uw zijn geïnstalleerd MiSeqDx. Voor Local Run Manager, raadpleeg Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx (documentnr. 100000011880) en Workflowhandleiding voor analysemodule CF 139-Variant 2.0 in Local Run Manager (documentnr. 1000000100945) of Local Run Manager CF 139-Variant 2.0 Micro-analysemodule workflowhandleiding (documentnr. 200017946).

## Interpretatie van de resultaten voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

De Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay is ontworpen om alle eiwitcoderende regio's in het CFTR-gen te sequencen voor de 27 exons, 5–30 basen van flankerende intronische sequentie, ~100 nt flankerende sequentie op de 5'- en 3'-UTR's, en twee diepe intronische mutaties (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T). De exacte gesequencede regio's worden vermeld in [Tabel 3](#). Daarnaast rapporteert de assay ook over de PolyTG/PolyT-variant en twee grote deleties (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23).

- Het assayrapport vermeldt de monsternamen en het genotype voor elke variant die voor een monster is gedetecteerd.
  - Voor elke variant worden de genomische coördinaat, de cDNA-naam van de Human Genome Variation Society (HGVS) en de eiwitnaam (indien beschikbaar) gerapporteerd.
  - Het varianttype wordt geïdentificeerd als enkelvoudige nucleotide-variant (SNV), deletie-insertie-variant (DIV), PolyTG/PolyT-variant (PolyTGPolyT) of grote deletie (DEL).
  - De genotypebepaling (heterozygoot of homozygoot) kan worden afgeleid uit de 'referentie'-basegegevens, die de referentiesequentie op die genomische coördinaat levert, en de 'resultaat'-beschrijving die de twee allelen op de genomische positie in het monster levert. Als de referentie bijvoorbeeld 'G' en het resultaat 'A/G' is, duidt dit op een G>A-verandering op die genomische

coördinaat en geeft dit aan dat het genotype heterozygoot is voor het variant-allel. Als de referentie 'G' en het resultaat 'T/T' is, duidt dit op een G>T-verandering op die genomische coördinaat en geeft dit aan dat het genotype homozygoot is voor het variant-allel.

- De sequentiediepte op de variantpositie wordt gegeven in het veld 'Depth' (Diepte) en de allelfrequentie in het gedeelte 'Frequency' (Frequentie).
- Het assayrapport biedt informatie over het bepalingspercentage voor elk monster. Het bepalingspercentage wordt berekend als het aantal variantposities/-regio's dat voldoet aan een vooraf gedefinieerde betrouwbaarheidsdrempel, gedeeld door het totale aantal onderzochte variantposities/-regio's.
  - De genomische coördinaat voor elke positie of regio waarvoor de betrouwbaarheidswaarde onder de drempel ligt, wordt afzonderlijk vermeld in het gedeelte 'Coordinates not called' (Niet-bepaalde coördinaten). Gebruikers moeten de niet-bepaalde posities vergelijken met de relevante variantgegevens om varianten te identificeren die mogelijk zijn gemist en hun bijbehorende populatiefrequenties, om te bepalen of het monster opnieuw moet worden getest.
- Een monsterresultaat wordt alleen als geldig beschouwd als het bepalingspercentage  $\geq 99\%$  is. Als het bepalingspercentage minder dan 99% is, wordt de prestatie gerapporteerd als 'Fail' (Mislukt) en moet het monster opnieuw worden getest.
- Het wordt aanbevolen om alle varianten die buiten het bereik vallen dat is gevalideerd in het nauwkeurigheidsonderzoek (zie [Nauwkeurigheid op pagina 82](#)) door de gebruiker te laten verifiëren met behulp van een gevalideerde referentiemethode voordat het eerste patiëntresultaat met die varianten wordt gerapporteerd.

**OPMERKING** Als er twee of meer varianten worden gedetecteerd, moet haplotype-fasering worden overwogen.

- Alle interpretaties van varianten moeten worden uitgevoerd door een gecertificeerde klinisch moleculair geneticus of iemand met gelijkwaardige kwalificaties volgens de lokale procedures en richtlijnen<sup>15</sup>. Mogelijke interpretatiereferenties omvatten, maar zijn niet beperkt tot: CFTR2 database<sup>11,12</sup>, Sosnay paper<sup>13</sup>, ACMG richtlijnen uit 2004<sup>1</sup>, en advies van de ACOG commissie uit 2011,<sup>2</sup>. Voor informatie over hoe resultaten worden berekend en gepresenteerd, of voor een beschrijving van de inhoud in een tekstbestandsrapport, raadpleegt u de handleidingen voor de analysesoftware die bij uw *MiSeqDx* is geïnstalleerd. Voor Local Run Manager, raadpleeg *Referentiehandleiding Local Run Manager-software voor MiSeqDx (documentnr. 100000011880)* en de *Workflowhandleiding voor analysemodule CF Clinical Seq 2.0 in Local Run Manager (documentnr. 1000000100946)* of Local Run Manager CF Clin Seq 2.0 Micro-analysemodule workflowhandleiding (documentnr. 200017945).
- De geneticus gebruikt de Local Run Manager-software om via een vervolkeuzemenu een interpretatiewaarde in te voeren voor elke variant die op een monster wordt gerapporteerd. De opties voor interpretatiewaarden zijn: CF-veroorzakend, Mutatie met variërende klinische gevolgen, Mutatie van

onbekende betekenis of Niet-CF veroorzakend. De ingevoerde waarde wordt toegevoegd aan het resultatenbestand en weergegeven in de interpretatiekolom van het rapport van de Clinical Sequencing Assay.

## Kwaliteitscontroleprocedures

Goede laboratoriumpraktijken schrijven voor dat controlemateriaal moet worden geëvalueerd om verschillen in bloedverwerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker die aanzienlijke variabiliteit in de resultaten kunnen veroorzaken op te sporen.

- **Negatieve controle (niet-sjabloon gerelateerde controle, NTC):** het gebruik van een negatieve controle is bij elke run vereist om mogelijke gevallen van contaminatie te detecteren. Het bepalingspercentage voor de negatieve controle moet minder dan 10% zijn. Als een negatieve controle een bepalingspercentage van > 10% genereert en er een sjabloonlijnwassing is uitgevoerd voor de vorige run, kan er contaminatie zijn opgetreden tijdens de verwerking van de assay. De assay wordt als mislukt beschouwd en de hele assay moet worden herhaald, te beginnen bij de bibliotheekvoorbereiding. Het negatieve controlemonster wordt als Pass (Geslaagd) gerapporteerd als het een bepalingspercentage van  $\leq 10\%$  genereert en als Fail (Mislukt) als het bepalingspercentage > 10% is.



### LET OP

Het is van essentieel belang om de sjabloonlijnwassing na elke sequencing-run uit te voeren om een verhoogd bepalingspercentage van de negatieve controle te voorkomen. Als het bepalingspercentage van de negatieve controle > 10% is en er tijdens de vorige run geen sjabloonlijnwassing is uitgevoerd, wordt aanbevolen dat de gebruiker na de run een wassing met een sjabloonlijnwassing uitvoert en de sequencing-run herhaalt.

- **Positieve controles:** bij elke run is een DNA-monster voor positieve controle vereist. Het DNA-monster voor positieve controle moet een goed gekarakteriseerd monster zijn met ten minste één bekende CFTR-variant<sup>16</sup>. Illumina beveelt het gebruik van roterende positieve controles aan in overeenstemming met de technische normen en richtlijnen voor het testen van CF-mutaties van het ACMG uit 2008<sup>17</sup> en de klinische laboratoriumnormen van het ACMG voor next-generation sequencing uit 2013<sup>18</sup>. Het positieve controlemonster moet het verwachte genotype genereren. Als de positieve controle een ander genotype oplevert dan verwacht, kan er een fout zijn opgetreden bij het bijhouden van monsters of in de registratie van indexeringsprimers. De gehele assay moet worden herhaald, te beginnen met de bibliotheekvoorbereiding. Het positieve controlemonster wordt als Pass (Geslaagd) gerapporteerd als het een bepalingspercentage van  $\geq 99\%$  genereert en als Fail (Mislukt) als het bepalingspercentage < 99% is.
- **Wild-type controle:** het wild-type DNA-controlemonster wordt bij elke run aanbevolen. Het wild-type controlemonster moet een goed gekarakteriseerd monster zijn dat geen CFTR-varianten bevat. Het wild-type controlemonster moet het verwachte genotype opleveren. Als de wild-type controle een ander genotype oplevert dan verwacht, kan er een fout zijn opgetreden bij het bijhouden van monsters of in de registratie van indexeringsprimers. De gehele assay moet worden herhaald, te beginnen met de bibliotheekvoorbereiding.

- Een monsterresultaat wordt alleen als geldig beschouwd als het bepalingspercentage  $\geq 99\%$  is. Als het bepalingspercentage minder dan  $99\%$  is, wordt de prestatie gerapporteerd als 'Fail' (Mislukt) en moet het monster opnieuw worden getest.
- Voorafgaand aan het eerste gebruik van dit product in het laboratorium van de gebruiker, moet de werking van de assay worden geverifieerd door een aantal positieve en negatieve monsters met bekende prestatiekenmerken te testen.
- Alle kwaliteitscontrolevereisten moeten worden uitgevoerd in overeenstemming met de lokale en/of nationale voorschriften of accreditatievereisten.

## Prestatiekenmerken voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

De prestatiekenmerken voor de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay zijn gebaseerd op onderzoeken die gebruikmaken van de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay. De gelijkwaardigheid tussen de TruSight- en MiSeqDx-assays wordt gegeven in [Prestatie-equivalentie met Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay op pagina 80](#).

## Nauwkeurigheid

De nauwkeurigheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay werd beoordeeld door 500 monsters te evalueren die een grote verscheidenheid aan CFTR-varianten uit vier afzonderlijke bronnen vertegenwoordigden. De primaire bron voor de nauwkeurighedsgegevens was een klinisch nauwkeurigheidsonderzoek dat werd uitgevoerd met een panel van 366 monsters. De meerderheid ( $n= 355$ ) van de monsters bestond uit gearchiveerde, geanonimiseerde klinische gDNA-monsters geïsoleerd uit menselijk bloed. De overige 11 monsters werden verkregen uit in de handel verkrijgbare cellijnmonsters.

De gegevens van dit onderzoek werden aangevuld met nauwkeurighedsgegevens van 68 cellijnmonsters die werden geëvalueerd in het reproduceerbaarheidsonderzoek, 14 klinische monsters van het analytische onderzoek naar de extractiemethode-evaluatie en 52 synthetische plasmidemonsters. De synthetische plasmiden waren ontworpen om de genomische context van de zeldzame varianten te omvatten en bevatten overall van één tot negen varianten binnen hetzelfde construct. Ze werden gelineariseerd, verdund tot genomische DNA-equivalente copy numbers en gemengd met menselijke genomische DNA-monsters van wild-type genotype met equivalente copy numbers om een heterozygoot monster na te bootsen.

De genotyperingsresultaten voor 137 SNV/kleine indel-locaties, inclusief de PolyTG/PolyT-regio, werden vergeleken met de bidirectionele Sanger-sequentieanalyse. Voor de twee grote deleties in het panel werden twee gevalideerde op PCR gebaseerde analyses als referentiemethode gebruikt. Elke duplex PCR-analyse maakte gebruik van twee primersets om onderscheid te maken tussen wild-type, heterozygote en homozygote

genotypen. Een van de primersets was ontworpen om de deletiebreekpunten te flankeren, terwijl de andere een regio binnen de deletie amplificeerde. De twee producten werden gedetecteerd door scheiding op grootte op een agarosegel.

De PCR-analyses werden gevalideerd met behulp van een panel van 28 monsters (22 monsters voor elke deletie) bestaande uit cellijn- en van bloed afgeleide genomische DNA-monsters en synthetische plasmiden, die de WT-, HET- en HOM-genotypen voor elke grote deletie omvatten. Bevestigd werd dat de PCR-analyses 100% specificiteit en reproduceerbaarheid hadden voor alle geteste monsters, door evaluatie van PCR-producten op een agarosegel. De nauwkeurigheid van de PCR-analyses werd bevestigd met behulp van Sanger-sequencing en bleek voor alle monsters 100% te zijn.

De nauwkeurigheid werd voor elk genotype bepaald door middel van drie statistische metingen. De positieve overeenkomst (PA) werd berekend voor elk variantgenotype door het aantal monsters met overeenstemmende variantbepalingen te delen door het totale aantal monsters met die variant zoals geïdentificeerd door de referentiemethoden. De negatieve overeenkomst (NA) werd berekend voor alle wild-type (WT) posities door het aantal concordante WT-posities te delen door het totale aantal WT-posities zoals gedefinieerd door de referentiemethoden. De algehele overeenstemming (OA) werd berekend over alle gerapporteerde posities door het aantal concordante WT- en variantposities te delen door het totale aantal gerapporteerde posities zoals bepaald door de referentiemethoden.

De Cystic Fibrosis 139-Variant Assay had een genotype-niveau PA van 100%. De NA voor alle WT-posities was > 99,99% en de OA voor alle gerapporteerde posities was > 99,99%. Alle testresultaten zijn gebaseerd op initiële testen.



Tabel 14 Algemene nauwkeurigheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalinge n per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalinge n (Wild- type)	Aantal onjuiste bepalinge n	Aantal niet- bepalinge n	Positieve overeenkom st (%)	Negatieve overeenkom st (%)	Algehele overeenkom st (%)
				Klinische monster s	Cellijnmonster s	Synthetisch e monsters						
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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalinge n per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalinge n (Wild- type)	Aantal onjuiste bepalinge n	Aantal niet- bepalinge n	Positieve overeenkom st (%)	Negatieve overeenkom st (%)	Algehele overeenkom st (%)
				Klinische monster s	Cellijnmonster s	Synthetisch e monsters						
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalingen per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalingen (Wild-type)	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters						
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalingen per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalingen (Wild-type)	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters						
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
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
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+1G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalinge n per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalinge n (Wild- type)	Aantal onjuiste bepalinge n	Aantal niet- bepalinge n	Positieve overeenkom st (%)	Negatieve overeenkom st (%)	Algehele overeenkom st (%)
				Klinische monster s	Cellijnmonster s	Synthetisch e monsters						
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
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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalinge n per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalinge n (Wild- type)	Aantal onjuiste bepalinge n	Aantal niet- bepalinge n	Positieve overeenkom st (%)	Negatieve overeenkom st (%)	Algehele overeenkom st (%)
				Klinische monster s	Cellijnmonster s	Synthetisch e monsters						
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_1330insAGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1,6 kb 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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalingen per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalingen (Wild-type)	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters						
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A <sup>¶</sup>	SNV	c.2490+1G>T <sup>¶</sup>	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P <sup>^</sup>	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0 <sup>^</sup>	0	100	100	100
Y1092X (C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
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

Variant (Algemene naam)	Variant Type	cDNA-naam	Totaal aantal bepalingen per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalingen (Wild-type)	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters						
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_ 4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT <sup>€</sup>	PolyTG/Poly T	c.1210-12T [5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	Niet van toepassing	100
I506V <sup>¥</sup>	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	Niet van toepassing	100	100
I507V <sup>¥</sup>	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	Niet van toepassing	100	100
F508C <sup>¥</sup>	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	Niet van toepassing	100	100
<b>Totaal</b>			67522		557		66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV is een acroniem voor deletie-insertie-variant.

\* Het Sanger-rapport gaf de P205S-variant aan als heterozygoot voor het klinische monster. Een beoordeling van de Sanger-sporengegevens gaf echter aan dat de variant feitelijk homozygoot was en onjuist was gerapporteerd. De MiSeqDx rapporteerde de variant als homozygoot.

§ Een synthetisch monster dat heterozygoot was voor exon 8 werd gerapporteerd als heterozygoot voor de variant CFTR dele22, 23. Nader onderzoek wees uit dat dit resultaat waarschijnlijk afkomstig was van een kleine contaminatie.

^ Er werd vastgesteld dat het originele synthetische heterozygote monster onjuist was geprepareerd. Toen het vervolgens werd getest nadat het opnieuw was bereid, met hetzelfde plasmide, werd het gedetecteerd.

€ Wanneer R117H positief is, wordt aanvullend de PolyTG/PolyT-variant gerapporteerd.

¥ In het geval van één homozygote F508del-variant werden bovendien drie extra wild-type basen (d.w.z. variant I506V, I507V, F508C) gerapporteerd die niet in het monster werden geïdentificeerd.

¶ Het oorspronkelijke validatie-onderzoek voor de analyse omvatte twee synthetische monsters die de nucleotideverandering c.2490+1G>T voor variant 2622+1 G>A bevatten (gegevens zijn opgenomen in deze tabel). Een tweede validatie-onderzoek werd later uitgevoerd met een synthetisch monster met de nucleotideverandering c.2490+1G>A ter ondersteuning van de daadwerkelijke nucleotideverandering (c.2490+1G>A) die met de variant wordt geassocieerd.



Tabel 15 Nauwkeurigheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay voor I506V, I507V en F508C.

Variant (algemene naam)	Totaal aantal bepalingen per variant	Positieve bepalingen (varianten)			Negatieve bepalingen (wild-type)	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
		Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters						
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

Tabel 16 Nauwkeurigheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay voor PolyTG/PolyT-varianten

PolyTG/PolyT- genotype	Aantal klinische monsters	Aantal cellijnmonsters	Aantal synthetische monsters	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen*	% nauwkeurigheid
(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

PolyTGPolyT- genotype	Aantal klinische monsters	Aantal cellijnmonsters	Aantal synthetische monsters	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen*	% nauwkeurigheid
(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>Totaal**</b>		448		4	3	98,44

\* Monsters werden niet opnieuw getest.

^ Een van de afwijkende resultaten kwam van het reproduceerbaarheidsonderzoek. Het PolyTG/PolyT-resultaat voor het monster kwam overeen in alle 18 replicaten, maar week af van de bidirectionele Sanger-sequencing.

\*\* Het totale aantal monsters voor de PolyTG/PolyT-variant is 448. Alle synthetische monsters (n = 52) waren bereid door gelineariseerde plasmiden te mengen met een van de twee cellijnmonsters, die deel uitmaakten van het reproduceerbaarheidsonderzoek. Omdat de rapportage van de PolyTG/PolyT-variant voor deze aanvullende synthetische monsters tot overrapportage van de variant zou leiden, werden de synthetische monsters uitgesloten van deze analyse.

## Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay werd bepaald door middel van een geblindeerd onderzoek met drie testlocaties en twee operators op elke locatie. Twee goed gekarakteriseerde panels van elk 46 monsters werden door elk van de operators op elke locatie getest voor een totaal van 810 bepalingen per locatie. De panels bevatten een mix van genomisch DNA van lymfoblastoïdecellijnen met bekende varianten in het *CFTR*-gen, evenals leukocyt-verarmd bloed verrijkt met lymfoblastoïdecellijnen met bekende varianten in het *CFTR*-gen. De bloedmonsters werden verstrekt om opname van de extractiestappen mogelijk te maken die worden gebruikt om gDNA voor te bereiden dat dient als de primaire input voor de assayworkflow.

Het slagingspercentage van monsters, gedefinieerd als het aantal monsters dat bij de eerste poging aan de metrische QC-vereisten voldoet, was 99,9%.

De positieve overeenkomst op genotypeniveau voor alle varianten was 99,77%. De negatieve overeenkomst voor alle WT-posities was 99,88% en de algehele overeenkomst voor alle gerapporteerde posities was 99,88%. Alle testresultaten zijn gebaseerd op initiële testen. Er werden geen herhalingstests uitgevoerd voor het reproduceerbaarheidsonderzoek.

Tabel 17 Reproduceerbaarheid van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
A	1	S549N (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (Het)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (Het)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/W1282X (Het)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (Het)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kb C>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

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
A	16	F508del (Hom)	I506V, I507V, F508C niet aanwezig	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (Het)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (Hom)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (Hom)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	100	100
A	39	F508del/3849+10kb C>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

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
A	45	N1303K (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (Hom)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	100	100
B	62	G330X (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100



Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Niet van toepassing	100	100
B	64	R347H (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Niet van toepassing	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	Niet van toepassing	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

Panel	Monsternr.	Monstergenotype	Varianten	Totaal aantal bepalingen per locatie	Positieve overeenkomstige bepalingen (varianten)			Negatieve overeenkomstige bepalingen (wild-type)			Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Algehele overeenkomst (%)
					Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3					
B	82	R347P/F508del (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (Het)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (Hom)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>§</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	Niet van toepassing	100	100
B	89	F508del/2143delT (Het)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (Het)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
<b>Totaal</b>				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

\* De wild-type locatie die overeenkomt met de N1303K-variant voor één replicaat resulteerde in een niet-bepaling vanwege onvoldoende dekking.

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

\*\* Er zijn aanwijzingen dat monsters 9 en 10 vóór de bibliotheekvoorbereiding waarschijnlijk door de operator werden verwisseld.

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

Tabel 18 Aanvullende informatie varianten reproduceerbaarheidsonderzoek

Variatie (algemene naam)	Varianttype	CFTR- genregio
PolyTG/PolyT	Samengesteld DIV*	Intron 9
2183AA>G	Samengesteld DIV*	Exon 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1- Intron3
1154insTC	DIV*	Exon 8
I507del	DIV*	Exon 11
F508del	DIV*	Exon 11
2143delT	DIV*	Exon 14
3659delC	DIV*	Exon 22
3876delA	DIV*	Exon 23
394delTT	DIV in homopolymere regio*	Exon 3
1078delT	DIV in homopolymere regio*	Exon 8
2184delA	DIV in homopolymere regio*	Exon 14
3905insT	DIV in homopolymere regio*	Exon 23
E60X	SNV	Exon 3
R75X	SNV	Exon 3
G85E	SNV	Exon 3
E92X	SNV	Exon 4
R117H	SNV	Exon 4
Y122X	SNV	Exon 4
621+1G>T	SNV	Intron 4

Variatie (algemene naam)	Varianttype	CFTR- genregio
G178R	SNV	Exon 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Exon 6
G330X	SNV	Exon 8
R334W	SNV	Exon 8
I336K	SNV	Exon 8
R347P	SNV	Exon 8
R347H	SNV	Exon 8
A455E	SNV	Exon 10
Q493X	SNV	Exon 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Exon 12
S549N	SNV	Exon 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Exon 12
G551D	SNV	Exon 12
R553X	SNV	Exon 12
R560T	SNV	Exon 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Exon 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16

Variatie (algemene naam)	Varianttype	CFTR-genregio
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X (C>A)	SNV	Exon 20
M1101K	SNV	Exon 20
R1158X	SNV	Exon 22
R1162X	SNV	Exon 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Exon 23
N1303K	SNV	Exon 24

\* DIV is een acroniem voor deletie-insertie-variant.

## DNA-extractie

Drie veelgebruikte, in de handel verkrijgbare extractiemethoden die Magnetische-parextractie, alcoholprecipitatie en silicafilterkolomisolatiemethoden vertegenwoordigen, werden geëvalueerd met behulp van EDTA anti-gecoaguleerd volbloed. In het onderzoek werden in totaal 14 unieke bloedmonsters gebruikt die wild-type en drie mutante genotypen vertegenwoordigen (drie monsters met F508del, één monster met I506V en één monster met D110H). De drie DNA-extractiemethoden werden onafhankelijk getest door twee verschillende operators die elk drie runs per extractiemethode uitvoerden. Elke extractie werd door elke operator op verschillende dagen uitgevoerd. De DNA-concentratie en A260/A280-verhouding van de geëxtraheerde gDNA-monsters werd bepaald met behulp van spectrofotometrie. De totale monsterbatchgrootte voor elke extractiemethode in dit onderzoek was 168 (14 monsters x 2 operators/extractiemethode x 3 runs/operator x 2 replicaten/geëxtraheerd gDNA-monster).

Extractiemethode	Aantal geteste monsters	Bepalingspercentage	Nauwkeurigheid	Percentage monsters eerste keer geslaagd*
Alcoholprecipitatie	168	100%	100%	100%
Silicafilterkolomisolatie	168	100%	100%	100%
Magnetische-parextractie	168	100%	100%	100%

\* Percentage monsters met een bepalingpercentage van > 99% tijdens de eerste run.

## DNA-input

Het DNA-inputbereik van de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay werd geëvalueerd door een seriële verdunningsstudie uit te voeren met 14 representatieve DNA-monsters die 16 unieke CF-varianten bevatten.

Elk monster werd dubbel getest op negen DNA-inputniveaus, variërend van 1250 – 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng en 1 ng). Voor het bepalen van de nauwkeurigheid werden monstergenotypen vergeleken met de gegevens van de bidirectionele Sanger-sequencing en werden de deleties vergeleken met PCR-analyse. De inputniveaus 1250 ng en 25 ng werden geïdentificeerd als de respectievelijke boven- en ondergrens voor DNA-input, omdat ze een slagingspercentage tijdens de eerste run hadden van  $\geq 95\%$  zonder onjuiste bepalingen (100% nauwkeurigheid en bepalingpercentage).

DNA-inputs van 1250 ng, 250 ng en 100 ng werden verder getest met vier representatieve DNA-monsters en ten minste 20 replicaten per DNA-inputniveau voor elk monster ( $n=4 \times 20=80$  monsters), terwijl de ondergrens van 25 ng werd getest met 14 monsters, 20 replicaten voor elk monster ( $n=14 \times 20=280$  monsters). De nauwkeurigheid en het slagingspercentage voor monsters tijdens de eerste run was 100% op alle DNA-inputniveaus.

De resultaten geven aan dat de Cystic Fibrosis 139-Variant Assay in het DNA-inputbereik van 1250–25 ng kan worden gebruikt om nauwkeurige resultaten te produceren.

## Interfererende stoffen

Om de impact van interfererende stoffen op het Cystic Fibrosis 139-Variant Assay te beoordelen, werden de prestaties van de assay beoordeeld in aan- en afwezigheid van mogelijk interfererende stoffen. In het onderzoek werden acht volbloedmonsters getest, waaronder drie CF-positieve monsters met unieke genotypen. Vier endogene interfererende stoffen (bilirubine, cholesterol, hemoglobine en triglyceride) werden getest door ze voorafgaand aan de DNA-extractie aan bloedmonsters toe te voegen. De concentratielimieten voor elke stof worden vermeld in de volgende tabel. Om de interferentie als gevolg van bloedafname (korte afname) te beoordelen, werd bovendien EDTA toegevoegd aan bloedmonsters, en om interferentie als gevolg van monstervoorbereiding te beoordelen, werd de laatste wasbuffer van een silicafilterkolomisolatiemethode toegevoegd aan gezuiverd genomisch DNA.

De Cystic Fibrosis 139-Variant Assay behaalde een bepalingpercentage van 100% voor alle geteste monsters en een reproduceerbaarheid 100% in genotypebepalingen tussen monsters in aan- en afwezigheid van interfererende stoffen.

Om het effect van multiplexing-indexprimerinterferentie te beoordelen, werd een kruisbesmettingsonderzoek uitgevoerd met twee monsters, elk met unieke homozygote genotypen op vier verschillende genomische posities, en twee respectieve indexprimers. Bij contaminatieniveaus van < 40% werd geen verandering in de variantbepaling waargenomen. Het monstergenotype werd heterozygoot wanneer de contaminatieniveaus  $\geq$  40% waren.

Er werd geen interferentie waargenomen van een van de endogene of exogene interfererende stoffen.

Teststof	Totaal aantal replicaten	Concentratie getest in bloed (bovengrens)	Concentratie getest in bloed (ondergrens)	Bepalingspercentage
Bilirubine	16	684 $\mu$ mol/l	137 $\mu$ mol/l	100%
Cholesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Hemoglobine	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Triglyceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

## Monsterindexering

Monsterindexprimers worden in de assay gebruikt om een unieke streepjescode toe te kennen aan elk monster-DNA, waardoor het mogelijk is om meerdere monsters samen te voegen in een enkele sequencing-run. In totaal werden er 96 monsterindexen getest met behulp van acht unieke DNA-monsters om het vermogen van de assay te verifiëren om consistent een genotyperingsbepaling te verrichten voor een bepaald monster voor

verschillende indexeringsprimercombinaties. Elk monster werd getest met 12 verschillende combinaties van indexeringsprimers. De monsterresultaten werden vergeleken met de gegevens van bidirectionele Sanger-sequencing voor alle posities/varianten behalve de twee grote deleties, die werden bevestigd met behulp van een duplex PCR-analyse. De reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid waren 100% voor alle monster/indexprimercombinaties.

## Prestatie-equivalentie met Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

De TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (TruSight CF139) gebruikt dezelfde workflow en reagentia voor bibliotheekvoorbereiding als de Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay (MiSeqDx CF139). TruSight CF139 gebruikt de MiSeqDx Reagent Kit v3 terwijl de MiSeqDx CF139 de sequencing-reagentia gebruikt die zijn opgenomen in de assay. Om de gelijkwaardigheid tussen TruSight CF139 en MiSeqDx CF139 aan te tonen, werden de resultaten van negen TruSight CF139-runs vergeleken met een enkele MiSeqDx CF139-run als gouden standaard. De TruSight CF139-runs werden uitgevoerd met een doorvoer van 96 monsters (maximale monsterdoorvoer voor TruSight CF139) en de MiSeqDx CF139 run met een doorvoer van 48 monsters (maximale monsterdoorvoer voor MiSeqDx CF139). De bronnen van variabiliteit opgenomen in TruSight CF139-runs omvatten drie bibliotheekvoorbereidingsgebeurtenissen (elk met een unieke partij TruSight Cystic Fibrosis), drie operators, drie MiSeqDx-instrumenten en drie partijen van de MiSeqDx Reagent Kit v3.

De variantbepalingen van de TruSight CF139-runs werden vergeleken met bepalingen van de MiSeqDx CF139-run. In elke TruSight CF139-run werden 47 unieke monsters opgenomen, met 2-3 replicaten per monster (95 DNA-monsters en 1 NTC per run). Voor de MiSeqDx CF139-run werden dezelfde 47 monsters gesequencet als singleton (47 DNA-monsters + 1 NTC per run). Het monsterpanel bestond uit Coriell DNA-monsters geëxtraheerd uit geïmmortaliseerde cellijnen en omvatte monsters die elk allel van de ACMG 23-mutaties, deletie-insertie-varianten (inclusief insertie/deleties in homopolymere regio's en insertie-met-deletie in dezelfde regio), homozygote varianten, samengestelde heterozygote varianten, een van de beoogde grote deleties, een veel voorkomende PolyTG/PolyT-variant, talrijke enkelvoudige nucleotidevarianten en een monster zonder gedetecteerde varianten vertegenwoordigen. Een samenvatting van de resultaten per genotype is te vinden in [Tabel 19](#). De overeenkomst tussen assays per varianttype wordt weergegeven in [Tabel 20](#). De algehele (totale) overeenkomst tussen assays was > 99,99%.

**Tabel 19** De variantbepalende prestaties van TruSight CF 139-Variant Assay vergeleken met MiSeqDx CF 139-Variant Assay

	MiSeqDx CF 139-Variant Assay				
	Hom-variant	Het-variant	Wild-type	Niet-bepaling	Totaal



		MiSeqDx CF 139-Variant Assay				
TruSight CF 139-Variant Assay	Hom-variant	87	-	-	-	87
	Het-variant	-	1.098	-	-	1.098
	Wild-type	-	-	113.889	-	113.889
	Niet-bepaling	-	-	-	-	-
	Totaal	87	1.098	113.889	-	115.074

Tabel 20 Prestaties per varianttype van TruSight CF 139-Variant Assay vergeleken met MiSeqDx CF 139-Variant Assay

Varianttype	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	Overeenkomst met MiSeqDx CF 139 Assay
SNV	672	0	0	100,00% (672/672)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	495	0	0	100,00% (495/495)
PolyTG/PolyT	17	1	0	94,44% (17/18)
Geen (wild-type)	113.889	0	0	100,00% (113.889/113.889)
Totaal	115.091	1	0	>99,99% (115.091/115.092)

Er werd een enkele dissonante bepaling waargenomen tussen TruSight CF139 en MiSeqDx CF139. De specifieke onjuiste bepaling was een PolyTG/PolyT-variant. Een samenvatting van de PolyTG/PolyT-concordantie is te vinden in [Tabel 21](#). Aangezien het PolyTG/PolyT-genotype alleen wordt gerapporteerd als ook de R117H-variant wordt gedetecteerd, bevat de gegevensset alleen PolyTG/PolyT-bepalingen van een enkele DNA-bron.

Tabel 21 De PolyTG/PolyT-variant bepalende prestaties van de TruSight CF 139-Variant Assay vergeleken met de MiSeqDx CF 139-Variant Assay

		MiSeqDx CF 139-Variant Assay		
		(TG)12 (T)5 / (TG)10 (T)9	(TG)12 (T)5 / (TG)12 (T)5	Niet-bepaling
				Totaal

	MiSeqDx CF 139-Variant Assay				
TruSight CF 139-Variant Assay	(TG)12(T)5 / (TG)10 (T)9	17	-	-	17
	(TG)12(T)5 / (TG)12 (T)5	1	-	-	1
	Niet- bepaling	-	-	-	-
	Totaal	18	-	-	18

## Prestatiekenmerken voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

De prestatiekenmerken voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay zijn gebaseerd op onderzoeken die gebruikmaken van de MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay. De gelijkwaardigheid tussen de TruSight- en MiSeqDx-assays wordt gegeven in [Prestatie-equivalentie met Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay op pagina 114](#).

## Nauwkeurigheid

De nauwkeurigheid van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay werd beoordeeld door 500 monsters te evalueren die een grote verscheidenheid aan CFTR-varianten uit vier afzonderlijke bronnen vertegenwoordigden. De primaire bron voor de nauwkeurighedsgegevens was een klinisch nauwkeurigheidsonderzoek dat werd uitgevoerd met een panel van 366 monsters. De meerderheid (n= 355) van de monsters bestond uit gearchiveerde, geanonimiseerde klinische gDNA-monsters geïsoleerd uit menselijk bloed. De overige 11 monsters werden verkregen uit in de handel verkrijgbare cellijnmonsters.

De gegevens van dit onderzoek werden aangevuld met nauwkeurighedsgegevens van 68 cellijnmonsters die werden geëvalueerd in het reproduceerbaarheidsonderzoek, 14 klinische monsters van het analytische onderzoek naar de extractiemethode-evaluatie en 52 synthetische plasmidemonsters. De synthetische plasmiden waren ontworpen om de genomische context van de zeldzame varianten te omvatten en bevatten overal van één tot tien varianten binnen hetzelfde construct. Ze werden gelineariseerd, verdund tot genomische DNA-equivalente copy numbers en gemengd met menselijke genomische DNA-monsters van wild-type genotype met equivalente copy numbers om een heterozygoot monster na te bootsen.

Voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay werden in totaal 5206 posities vergeleken met de referentiemethoden van bidirectionele Sanger-sequencing en PCR-tests. De genotyperingsresultaten voor SNV en kleine InDel-locaties, inclusief de PolyTG/PolyT-regio werden vergeleken met de bidirectionele Sanger-sequentieanalyse.

Voor de twee grote deleties in het panel werden twee gevalideerde op PCR gebaseerde analyses als referentiemethode gebruikt. Elke duplex PCR-analyse maakte gebruik van twee primersets om onderscheid te maken tussen wild-type, heterozygote en homozygote genotypen. Een van de primersets was ontworpen om de deletiebreekpunten te flankeren, terwijl de andere een regio binnen de deletie amplificeerde. De twee producten werden gedetecteerd door scheiding op grootte op een agarosegel. De PCR-analyses werden gevalideerd met behulp van een panel van in totaal 28 monsters (22 monsters voor elke deletie) bestaande uit cellijn- en van bloed afgeleide genomische DNA-monsters en synthetische plasmiden, die de WT-, HET- en HOM-genotypen voor elke grote deletie omvatten. Bevestigd werd dat de PCR-analyses 100% specificiteit en reproduceerbaarheid hadden voor alle geteste monsters, door evaluatie van PCR-producten op een agarosegel. De nauwkeurigheid van de PCR-analyses werd bevestigd met behulp van Sanger-sequencing en bleek voor alle monsters 100% te zijn.

De nauwkeurigheid werd voor elk genotype bepaald door middel van drie statistische metingen. De positieve overeenkomst (PA) werd berekend voor elk variantgenotype door het aantal monsters met overeenstemmende variantbepalingen te delen door het totale aantal monsters met die variant zoals geïdentificeerd door de referentiemethoden. De negatieve overeenkomst (NA) werd berekend voor alle wild-type (WT) posities door het aantal concordante WT-posities te delen door het totale aantal WT-posities zoals gedefinieerd door de referentiemethoden. De algehele overeenstemming (OA) werd berekend over alle gerapporteerde posities door het aantal concordante WT- en variantposities te delen door het totale aantal gerapporteerde posities zoals bepaald door de referentiemethoden.

De Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay had een PA op genotype-niveau van 99,66%, inclusief PolyTG/PolyT-varianten (100% exclusief PolyTG/PolyT-varianten). De NA voor alle WT-posities was > 99,99% en de OA voor alle gerapporteerde posities was > 99,99%.

Tabel 22 Algehele nauwkeurigheid voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
117120141	c.-8G>C^	SNV	Exon1	25	3	0	0	0	100
117120145	c.-4G>C^	SNV	Exon1	3	2	0	0	0	100
M1V	c.1A>G	SNV	Exon1	0	0	1	0	0	100
CFTR dele2, 3	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	Del	Intron1	4	1	0	0	0	100
R31C	c.91C>T	SNV	Exon2	3	1	0	0	0	100
Q39X	c.115C>T	SNV	Exon2	0	0	1	0	0	100
E60X	c.178G>T	SNV	Exon3	6	1	0	0	0	100
P67L	c.200C>T	SNV	Exon3	1	0	1	0	0	100
R74W	c.220C>T	SNV	Exon3	0	2	0	0	0	100
R74Q	c.221G>A	SNV	Exon3	2	0	0	0	0	100
R75X	c.223C>T	SNV	Exon3	3	1	0	0	0	100
R75Q	c.224G>A	SNV	Exon3	20	1	0	0	0	100
G85E	c.254G>A	SNV	Exon3	6	2	0	0	0	100
394delTT	c.262_263 delTT	DIV	Exon3	3	1	0	0	0	100
405+1G>A	c.273+1G>A	SNV	Intron3	0	0	1	0	0	100
406-1G>A	c.274-1G>A	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
E92K	c.274G>A	SNV	Exon4	0	0	1	0	0	100
E92X	c.274G>T	SNV	Exon4	0	1	1	0	0	100
Q98X	c.292C>T	SNV	Exon4	0	0	2	0	0	100
444delA	c.312delA	DIV	Exon4	0	2	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
457TAT>G	c.325_327 delTAT insG	DIV	Exon4	0	0	1	0	0	100
D110H	c.328G>C	SNV	Exon4	1	0	1	0	0	100
R117C	c.349C>T	SNV	Exon4	4	0	0	0	0	100
R117H	c.350G>A	SNV	Exon4	17	2	0	0	0	100
Y122X	c.366T>A	SNV	Exon4	0	1	0	0	0	100
F143LfsX10	c.425delT	DIV	Exon4	0	1	0	0	0	100
574delA	c.442delA	DIV	Exon4	0	0	2	0	0	100
Q151K	c.451C>A	SNV	Exon4	1	0	0	0	0	100
621+1G>T	c.489+1G>T	SNV	Intron4	7	5	0	0	0	100
621+3A>G	c.489+3A>G	SNV	Intron4	1	0	0	0	0	100
663delT	c.531delT	DIV	Exon5	1	0	1	0	0	100
G178R	c.532G>A	SNV	Exon5	1	1	0	0	0	100
711+1G>T	c.579+1G>T	SNV	Intron5	3	1	0	0	0	100
711+3A>G	c.579+3A>G	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
711+5 G>A	c.579+5G>A	SNV	Intron5	0	0	1	0	0	100
712-1 G>T	c.580-1G>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
H199Y	c.595C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
P205S	c.613C>T	SNV	Exon6	1	0	1	0	0**	100
L206W	c.617T>G	SNV	Exon6	8	1	0	0	0	100
A209S	c.625G>T	SNV	Exon6	0	1	0	0	0	100
Q220X	c.658C>T	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
L227R	c.680T>G	SNV	Exon6	0	0	1	0	0	100
852del22	c.720_741 delAGGG AGAATG ATGATG AAGTAC	DIV	Exon6	0	0	1	0	0	100
E279D	c.837A>T	SNV	Exon7	1	0	0	0	0	100
R297Q	c.890G>A	SNV	Exon8	2	0	0	0	0	100
1078delT	c.948delT	DIV	Exon8	1	1	0	0	0	100
L320V	c.958T>G	SNV	Exon8	1	0	0	0	0	100
G330X	c.988G>T	SNV	Exon8	1	1	0	0	0	100
R334W	c.1000C>T	SNV	Exon8	6	1	0	0	0	100
I336K	c.1007T>A	SNV	Exon8	0	1	0	0	0	100
T338I	c.1013C>T	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1154insTC	c.1022_10 23insTC	DIV	Exon8	0	1	0	0	0	100
S341P	c.1021T>C	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
R347H	c.1040G>A	SNV	Exon8	6	1	1	0	0	100
R347P	c.1040G>C	SNV	Exon8	3	2	0	0	0	100
R352Q	c.1055G>A	SNV	Exon8	5	0	0	0	0	100
Q359K/ T360K	c.[1075C>A ;1079C>A]	SNV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1213delT	c.1081delT	DIV	Exon8	0	0	1	0	0	100
1248+1G>A	c.1116+1G>A	SNV	Intron8	0	0	1	0	0	100
1259insA	c.1127_11 28insA	DIV	Exon9	0	0	2	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
W401X (c.1202G>A)	c.1202G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
W401X (c.1203G>A)	c.1203G>A	SNV	Exon9	0	0	1	0	0	100
1341+1G>A	c.1209+1G>A	SNV	Intron9	0	0	2	0	0	100
PolyTG/PolyT	Niet van toepassing	PolyTG PolyT	Intron9	369	79	52	3	4 <sup>#</sup>	98,60
1461ins4	c.1329_ 1330ins AGAT	DIV	Exon10	0	0	1	0	0	100
A455E	c.1364C>A	SNV	Exon10	4	2	0	0	0	100
1525-1G>A	c.1393-1G>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>A)	c.1397C>A	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
S466X (C>G)	c.1397C>G	SNV	Exon11	1	0	1	0	0	100
L467P	c.1400T>C	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
V470M	c.1408G>A	SNV	Exon11	311	71	0	0	0	100
1548delG	c.1418delG	DIV	Exon11	1	0	1	0	0	100
P477S	c.1429C>T	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
S485T	c.1454G>C	SNV	Exon11	1	0	0	0	0	100
S489X	c.1466C>A	SNV	Exon11	0	0	2	0	0	100
S492F	c.1475C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
Q493X	c.1477C>T	SNV	Exon11	4	2	0	0	0	100
I506V	c.1516A>G	SNV	Exon11	7	0	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
I507del	c.1519_1521 delATC	DIV	Exon11	4	2	0	0	0	100
F508del	c.1521_1523 delCTT	DIV	Exon11	84	29	0	0	0	100
I507V	c.1519A>G	SNV	Exon11	0	1	0	0	0	100
F508C	c.1523T>G	SNV	Exon11	1	1	0	0	0	100
1677delTA	c.1545_1546 delTA	DIV	Exon11	1	0	0	0	0	100
V520F	c.1558G>T	SNV	Exon11	2	0	0	0	0	100
Q525X	c.1573C>T	SNV	Exon11	0	0	1	0	0	100
E527E	c.1581A>G	SNV	Exon11	3	2	0	0	0	100
E528E	c.1584G>A	SNV	Exon11	6	2	0	0	0	100
1717-8G>A	c.1585-8G>A	SNV	Intron11	0	0	1	0	0	100
1717-1G>A	c.1585-1G>A	SNV	Exon12	4	1	0	0	0	100
G542X	c.1624G>T	SNV	Exon12	12	3	0	0	0	100
S549R (c.1645A>C)	c.1645A>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
S549N	c.1646G>A	SNV	Exon12	2	2	1	0	0	100
S549R (c.1647T>G)	c.1647T>G	SNV	Exon12	3	1	0	0	0	100
G551D	c.1652G>A	SNV	Exon12	8	3	0	0	0	100
Q552X	c.1654C>T	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R553X	c.1657C>T	SNV	Exon12	8	2	0	0	0	100
I556V	c.1666A>G	SNV	Exon12	1	0	0	0	0	100
L558S	c.1673T>C	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100



Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
A559T	c.1675G>A	SNV	Exon12	4	0	1	0	0	100
R560K	c.1679G>A	SNV	Exon12	0	0	1	0	0	100
R560T	c.1679G>C	SNV	Exon12	6	1	0	0	0	100
1811+1,6 kb A>G	c.1679+1,6 kbA>G	SNV	Intron12	0	0	1	0	0	100
1812-1 G>A	c.1680-1G>A	SNV	Exon13	0	2	0	0	0	100
A561T	c.1681G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
V562I	c.1684G>A	SNV	Exon13	1	0	0	0	0	100
Y569D	c.1705T>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
P574H	c.1721C>A	SNV	Exon13	0	1	0	0	0	100
G576A	c.1727G>C	SNV	Exon13	4	1	0	0	0	100
D579G	c.1736A>G	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
E585X	c.1753G>T	SNV	Exon13	0	0	1	0	0	100
1898+1G>A	c.1766+1G>A	SNV	Intron13	2	1	0	0	0	100
1898+3A>G	c.1766+3A>G	SNV	Intron13	0	0	1	0	0	100
H609R	c.1826A>G	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
D614G	c.1841A>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
R668C	c.2002C>T	SNV	Exon14	5	2	0	0	0	100
R668H	c.2003G>A	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
2143delT	c.2012delT	DIV	Exon14	2	1	0	0	0	100
K684TfsX4	c.2046_2047 delAA	DIV	Exon14	0	0	1	0	0	100
2183AA>G	c.2051_2052 delAAinsG	DIV	Exon14	3	1	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
2184delA	c.2052delA	DIV	Exon14	1	1	0	0	0	100
2184insA	c.2052_2053 insA	DIV	Exon14	3	0	1	0	0	100
S686Y	c.2057C>A	SNV	Exon14	0	1	0	0	0	100
R709X	c.2125C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
K710X	c.2128A>T	SNV	Exon14	3	0	0	0	0	100
E725K	c.2173G>A	SNV	Exon14	2	0	0	0	0	100
2307insA	c.2175_2176 insA	DIV	Exon14	3	0	2	0	0	100
L732X	c.2195T>G	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2347delG	c.2215delG	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
P750L	c.2249C>T	SNV	Exon14	1	0	0	0	0	100
V754M	c.2260G>A	SNV	Exon14	2	1	0	0	0	100
R764X	c.2290C>T	SNV	Exon14	1	0	2	0	0	100
2585delT	c.2453delT	DIV	Exon14	0	0	2	0	0	100
E822X	c.2464G>T	SNV	Exon14	0	0	2	0	0	100
2622+1G>A	c.2490+1G>T	SNV	Intron14	0	0	2	0	0	100
E831X	c.2491G>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
D836Y	c.2506G>T	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
W846X	c.2537G>A	SNV	Exon15	0	1	0	0	0	100
R851X	c.2551C>T	SNV	Exon15	0	0	1	0	0	100
T854T	c.2562T>G	SNV	Exon15	212	44	0	0	0	100
2711delT	c.2583delT	DIV	Exon15	0	0	1	0	0	100
V868V	c.2604A>G	SNV	Exon15	2	0	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
c.2657+2_ 2657+3insA	c.2657+2_ 2657+3insA	DIV	Intron16	0	0	1	0	0	100
2789+5G>A	c.2657+5G>A	SNV	Intron16	9	1	0	0	0	100
Q890X	c.2668C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
A923A	c.2769C>T	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
L927P	c.2780T>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S945L	c.2834C>T	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
M952T	c.2855T>C	SNV	Exon17	1	0	0	0	0	100
3007delG	c.2875delG	DIV	Exon17	0	0	1	0	0	100
T966T	c.2898G>A	SNV	Exon17	5	0	0	0	0	100
G970R	c.2908G>C	SNV	Exon17	0	0	1	0	0	100
S977F	c.2930C>T	SNV	Exon18	0	0	1	0	0	100
3120G>A	c.2988G>A	SNV	Exon18	1	0	0	0	0	100
3120+1G>A	c.2988+1G>A	SNV	Intron18	7	1	0	0	0	100
3121-1G>A	c.2989-1G>A	SNV	Exon19	0	0	1	0	0	100
L997F	c.2991G>C	SNV	Exon19	2	1	0	0	0	100
I1027T	c.3080T>C	SNV	Exon19	1	2	0	0	0	100
3272-26A>G	c.3140-26A>G	SNV	Intron19	0	1	0	0	0	100
F1052V	c.3154T>G	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1065P	c.3194T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
R1066C	c.3196C>T	SNV	Exon20	6	0	0	0	0	100
R1066H	c.3197G>A	SNV	Exon20	1	0	1	0	0	100
G1069R	c.3205G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
R1070W	c.3208C>T	SNV	Exon20	0	2	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
R1070Q	c.3209G>A	SNV	Exon20	0	1	0	0	0	100
L1077P	c.3230T>C	SNV	Exon20	0	0	1	0	0 <sup>‡</sup>	100
W1089X	c.3266G>A	SNV	Exon20	4	0	0	0	0	100
Y1092X (C>A)	c.3276C>A	SNV	Exon20	3	1	0	0	0	100
Y1092X (C>G)	c.3276C>G	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
T1095T	c.3285A>T	SNV	Exon20	7	0	0	0	0	100
M1101K	c.3302T>A	SNV	Exon20	2	2	0	0	0	100
E1104X	c.3310G>T	SNV	Exon20	0	0	1	0	0	100
c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	SNV	Intron20	0	1	0	0	0	100
D1152H	c.3454G>C	SNV	Exon21	10	1	0	0	0	100
V1153E	c.3458T>A	SNV	Exon21	1	0	0	0	0	100
R1158X	c.3472C>T	SNV	Exon22	7	1	0	0	0	100
R1162X	c.3484C>T	SNV	Exon22	5	1	0	0	0	100
R1162L	c.3485G>T	SNV	Exon22	0	2	0	0	0	100
3659delC	c.3528delC	DIV	Exon22	4	1	0	0	0	100
S1196X	c.3587C>G	SNV	Exon22	1	0	0	0	0	100
W1204X (c.3611G>A)	c.3611G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
W1204X (c.3612G>A)	c.3612G>A	SNV	Exon22	0	0	1	0	0	100
3791delC	c.3659delC	DIV	Exon22	2	0	0	0	0	100
I1234V	c.3700A>G	SNV	Exon22	1	0	1	0	0	100
S1235R	c.3705T>G	SNV	Exon22	9	1	0	0	0	100

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
3849+10 kbC>T	c.3717+ 12191C>T	SNV	Intron22	11	2	0	0	0	100
G1244E	c.3731G>A	SNV	Exon23	0	0	1	0	0	100
3876delA	c.3744delA	DIV	Exon23	6	1	0	0	0	100
S1251N	c.3752G>A	SNV	Exon23	1	0	1	0	0	100
3905insT	c.3773_3774 insT	DIV	Exon23	3	1	0	0	0	100
D1270N	c.3808G>A	SNV	Exon23	0	2	0	0	0	100
W1282X	c.3846G>A	SNV	Exon23	9	1	0	0	0	100
P1290P	c.3870A>G	SNV	Exon23	10	3	0	0	0	100
4005+1G>A	c.3873+1G>A	SNV	Intron23	0	0	1	0	0	100
4016insT	c.3884_3885 insT	DIV	Exon24	0	0	1	0	0	100
T1299T	c.3897A>G	SNV	Exon24	3	0	0	0	0	100
N1303K	c.3909C>G	SNV	Exon24	9	1	0	0	0	100
Q1313X	c.3937C>T	SNV	Exon24	0	0	1	0	0	100
G1349D	c.4046G>A	SNV	Exon25	0	1	0	0	0	100
4209TG TT>AA	c.4077_4080 delTGTT insAA	DIV	Exon25	0	0	1	0	0	100
CFTR dele22,23	c.3964-78_ 4242+577del	Del	Intron24	1	0	1	0	0	100
4382delA	c.4251delA	DIV	Exon27	0	0	1	0	0	100
Y1424Y	c.4272C>T	SNV	Exon27	6	2	0	0	0	100
Q1463Q	c.4389G>A	SNV	Exon27	150	32	0	0	0	100
<b>Totaal van alle varianten (PA)†</b>						2072	3	4	99,66

Genotype (Algemene naam/cDNA- naam/coördinaat)	cDNA-naam	Varianttype	Regio van CFTR-gen (hg19)	Positieve bepalingen (varianten)			Niet- bepalingen*	Onjuiste bepalingen	Positieve overeenkomst
				Klinische monsters	Cellijnmonsters	Synthetische monsters			
<b>Totaal alle WT (NA)</b>					2600928		1	2 <sup>§</sup>	> 99,99
<b>Totaal alle WT en varianten (OA)</b>					2603000		4	6	> 99,99

DIV is een acroniem voor deletie-insertie variant.

\* Monsters werden niet opnieuw getest.

^ Software rapporteert geen cDNA-naam voor deze genomische coördinaat.

\*\* Het Sanger-rapport vermeldde de P205S-variant als heterozygoot voor het klinische monster. Een beoordeling van de Sanger-sporengegevens gaf echter aan dat de variant feitelijk homozygoot was en onjuist was gerapporteerd. De MiSeqDx rapporteerde de variant als homozygoot.

# Een van de afwijkende resultaten kwam van het reproduceerbaarheidsonderzoek. Het PolyTG/PolyT-resultaat voor het monster kwam overeen in alle 18 replicaten, maar week af van de bidirectionele Sanger-sequencing.

¥ Er werd vastgesteld dat het originele synthetische heterozygote monster onjuist was geprepareerd. Toen het vervolgens werd getest nadat het opnieuw was bereid, met hetzelfde plasmide, werd het gedetecteerd.

† PA exclusief PolyTG/PolyT-bepalingen was 100%.

§ Een synthetisch monster dat heterozygoot was voor exon 8 werd gerapporteerd als heterozygoot voor de variant CFTR dele22, 23. Nader onderzoek wees uit dat dit resultaat waarschijnlijk afkomstig was van een kleine contaminatie. Bovendien konden Sanger-primers voor een tweede monster de variant Q1463Q niet volledig detecteren vanwege indels zowel stroomopwaarts als stroomafwaarts van de variantlocatie.

Tabel 23 PolyTG/PolyT-variant nauwkeurigheid voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

PolyTGPolyT- genotype	Aantal klinische monsters	Aantal cellijnmonsters	Aantal synthetische monsters	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen*	% nauwkeurigheid
(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

PolyTGPolyT- genotype	Aantal klinische monsters	Aantal cellijnmonsters	Aantal synthetische monsters	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet- bepalingen*	% nauwkeurigheid
(TG)10(T)7/(TG)10 (T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11 (T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12 (T)7	10	1	0	0	1	90,91
(TG)10(T)9/(TG)10 (T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11 (T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12 (T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12 (T)7	13	0	0	0	1	92,31
(TG)11(T)5/(TG)11 (T)7	6	0	0	1	0	83,33
(TG)11(T)7/(TG)11 (T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11 (T)9^	2	1	0	3	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12 (T)5	2	0	0	0	0	100

PolyTGPolyT-genotype	Aantal klinische monsters	Aantal cellijnmonsters	Aantal synthetische monsters	Aantal onjuiste bepalingen	Aantal niet-bepalingen*	% nauwkeurigheid
(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>Totaal</b>		448		4	3	98,44

\* Monsters werden niet opnieuw getest.

^ Een van de afwijkende resultaten kwam van het reproduceerbaarheidsonderzoek. Het PolyTG/PolyT-resultaat voor het monster kwam overeen in alle 18 replicaten, maar week af van de bidirectionele Sanger-sequencing.

## Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay werd bepaald door middel van een geblindeerd onderzoek met drie testlocaties en twee operators op elke locatie. Twee goed gekarakteriseerde panels van elk 46 monsters werden door elk van de operators op elke locatie getest voor een totaal van 276 monsterresultaten per operator. Het panel bevatte een mix van genomisch DNA van lymfoblastoïdecellijnen met bekende mutaties in het *CFTR*-gen, evenals leukocyt-verarmd bloed verrijkt met lymfoblastoïdecellijnen met bekende mutaties in het *CFTR*-gen. De bloedmonsters werden verstrekt om opname van de extractiestappen mogelijk te maken die worden gebruikt om gDNA voor te bereiden dat dient als de primaire input voor de assayworkflow.

Het slagingspercentage van monsters, gedefinieerd als het aantal monsters dat bij de eerste poging aan de metrische QC-vereisten voldoet, was 99,7%. Alle resultaten waren gebaseerd op initiële testen.

De PA op genotypeniveau voor alle varianten was 99,22% inclusief de PolyTG/PolyT-variant en 99,60% exclusief de PolyTG/PolyT-variant. De NA voor alle WT-posities was 99,70% en de OA voor alle gerapporteerde posities was 99,70%. De PA voor de PolyTG/PolyT-variant was 97,83%.



Tabel 24 Reproduceerbaarheid van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (exclusief PolyTG/PolyT-varianten)

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
1	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
1	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
2	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	5	6	0	1	94,44
2	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1477C>T	Q493X	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
3	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
6	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
6	c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.223C>T	R75X	6	18	6	6	6	0	0	100
7	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1519_1521delATC	I507del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
8	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
9	c.3846G>A	W1282X	6	18	6	5	6	0	1*	94,44
9	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
11, 39	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	12	36	12	12	12	0	0	100
11, 39	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.2988+1G>A	3120+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
12, 40	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
13	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.178G>T	E60X	6	18	6	6	6	0	0	100
13	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
14	c.3302T>A	M1101K	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
15	c.1584G>A	E528E	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
18, 42	c.-4G>C	117120145	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
18, 42	c.350G>A	R117H	12	36	12	12	12	0	0	100
19	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
19	c.579+1G>T	711+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100
20, 43	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.254G>A	G85E	12	36	12	12	12	0	0	100
20, 43	c.489+1G>T	621+1G>T	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1364C>A	A455E	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
21, 44	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
22	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.1679G>C	R560T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
22	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
25	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
26	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
27, 46	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1652G>A	G551D	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.1657C>T	R553X	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
27, 46	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
28	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	6	18	6	6	6	0	0	100
28	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
29	c.91C>T	R31C	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
30	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
32	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.3484C>T	R1162X	6	18	6	6	6	0	0	100
32	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100
33	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.1000C>T	R334W	6	18	6	6	6	0	0	100
34	c.3368-2A>T	c.3368-2A>T	6	18	6	6	6	0	0	100
35	c.1523T>G	F508C	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.254G>A	G85E	6	18	6	6	6	0	0	100
36	c.3454G>C	D1152H	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1007T>A	I336K	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
37	c.3705T>G	S1235R	6	18	6	6	6	0	0	100
38	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
47, 85	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.2657+5G>A	2789+5G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
47, 85	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
48, 86	c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1408G>A	V470M	12	36	12	11	12	1	0	97,22
48, 86	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	11	12	1	0	97,22
49, 87	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
49, 87	c.1766+1G>A	1898+1G>A	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.220C>T	R74W	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
50, 88	c.3808G>A	D1270N	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100
51, 89	c.2012delT	2143delT	12	36	12	12	12	0	0	100
52	c.3744delA	3876delA	6	18	6	6	6	0	0	100
53, 90	c.3773_3774insT	3905insT	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
54, 91	c.262_263delTT	394delTT	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1408G>A	V470M	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1519A>G	I507V	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.1521_1523delCTT	F508del	12	36	12	12	12	0	0	100

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
55, 92	c.2562T>G	T854T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.3080T>C	I1027T	12	36	12	12	12	0	0	100
55, 92	c.4389G>A	Q1463Q	12	36	12	12	12	0	0	100
56	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.3154T>G	F1052V	6	18	6	6	6	0	0	100
56	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
57	c.3209G>A	R1070Q	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
58	c.2991G>C	L997F	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
59	c.3205G>A	G1069R	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
60	c.617T>G	L206W	6	18	6	6	6	0	0	100
61	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
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



Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
62	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
62	c.988G>T	G330X	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1040G>A	R347H	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
64	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
65	c.948delT	1078delT	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
66	c.532G>A	G178R	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
67	c.1647T>G	S549R (c.1647T>G)	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.1646G>A	S549N	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
68	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2506G>T	D836Y	6	18	6	6	6	0	0	100
69	c.2537G>A	W846X	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.3485G>T	R1162L	6	18	6	6	6	0	0	100
70	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
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

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
71	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.274G>T	E92X	6	18	6	6	6	0	0	100
71	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
72	c.1022_1023insTC	1154insTC	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	5	1	0	94,44
72	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	5	1	0	94,44
73	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1624G>T	G542X	6	18	6	6	6	0	0	100
73	c.1826A>G	H609R	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	5	0	1	94,44
74	c.1429C>T	P477S	6	18	6	6	6	0	0	100
74	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
75	c.1408G>A	V470M	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
75	c.1721C>A	P574H	6	18	6	5	6	1^	0	94,44
76	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.425delT	F143LfsX10	6	18	6	6	6	0	0	100
76	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1364C>A	A455E	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
77	c.489+1G>T	621+1G>T	6	18	6	6	6	0	0	100

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
78	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1581A>G	E527E	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.1680-1G>A	1812-1 G>A	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.312delA	444delA	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.3870A>G	P1290P	6	18	6	6	6	0	0	100
78	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.220C>T	R74W	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
79	c.3808G>A	D1270N	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.-8G>C	117120141	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.1657C>T	R553X	6	18	6	6	6	0	0	100
80	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.1652G>A	G551D	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.2562T>G	T854T	6	18	6	6	6	0	0	100
81	c.4389G>A	Q1463Q	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1040G>C	R347P	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1408G>A	V470M	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.1521_1523delCTT	F508del	6	18	6	6	6	0	0	100
82	c.4272C>T	Y1424Y	6	18	6	6	6	0	0	100

Monster	HGVS-naam (of Locatie indien geen HGVS)	Variantnaam	Totale resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal* (alle locaties)		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen <sup>€</sup>	Onjuiste bepalingen	
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
<b>Totaal alle varianten (PA)** (inclusief gegevens PolyTG/PolyT in Tabel 25)</b>			2580	7740	2562	2553	2565	37	23	99,22
<b>Totaal alle WT (NA)</b>			2871132	8613396	2865930	2855526	2865932	26006	2	99,70
<b>Totaal alle WT en varianten (OA)</b>			2873712	8621136	2868492	2858079	2868497	26043	25	99,70

€ Monsters werden niet opnieuw getest.

^ Eén replicaat van elk van de monsters 5 en 75 had een bepalingpercentage van 0%. Nader onderzoek wees uit dat de monsters vóór de bibliotheekvoorbereiding waarschijnlijk niet aan de monsterplaat waren toegevoegd.

\* Na herbeoordeling bleek dat monsters 9 en 10 waarschijnlijk door de operator waren verwisseld vóór de bibliotheekvoorbereiding.

\*\* Exclusief de PolyTG/PolyT-varianten was de PA 99,60%.

Tabel 25 PolyTG/PolyT reproduceerbaarheid voor de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Panel	Monster	Genotype	Aantal resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal alle locaties		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen	Onjuiste bepalingen	
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%

Panel	Monster	Genotype	Aantal resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal alle locaties		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen	Onjuiste bepalingen	
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%
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%

Panel	Monster	Genotype	Aantal resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal alle locaties		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen	Onjuiste bepalingen	
A	21, 44	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	22	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	23	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	24, 45	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
A	25	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	26	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	27, 46	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	12	36	11	12	12	0	1	97,22%
A	28	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	29	(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	4	4	4	0	77,78%
A	30	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	31	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	32	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
A	33	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
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%

Panel	Monster	Genotype	Aantal resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal alle locaties		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen	Onjuiste bepalingen	
B	51, 89	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	52	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	53, 90	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	54, 91	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	55, 92	(TG)10(T)9/(TG)10(T)7	12	36	12	12	12	0	0	100%
B	56	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	57	(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	58	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	59	(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	60	(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	61	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	62	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	63	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	64	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	65	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	66	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	67	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	68	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	69	(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	70	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	71	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%

Panel	Monster	Genotype	Aantal resultaten		Overeenstemmende bepalingen			Totaal alle locaties		% overeenkomst
			Per locatie	Alle locaties	Locatie 1	Locatie 2	Locatie 3	Niet-bepalingen	Onjuiste bepalingen	
B	72	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	5	2	0	88,89%
B	73	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	74	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	75	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	5	6	1	0	94,44%
B	76	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	77	(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	78	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	5	6	6	1	0	94,44%
B	79	(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	80	(TG)11(T)7/(TG)11(T)9	6	18	0	0	0	0	18*	0%
B	81	(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	82	(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	83	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	6	18	6	6	6	0	0	100%
B	84	(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	6	18	6	6	6	0	0	100%
<b>Totaal PolyTG/PolyT-varianten (PA)</b>			<b>552</b>	<b>1656</b>	<b>537</b>	<b>540</b>	<b>543</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>97,83%</b>

\* Alle 18 monsters waren in overeenstemming met elkaar, maar niet in overeenstemming met de bidirectionele Sanger-sequencing.



## DNA-extractie

Drie veelgebruikte, in de handel verkrijgbare extractiemethoden die Magnetische-parextractie, alcoholprecipitatie en silicafilterkolomisolatiemethoden vertegenwoordigen, werden geëvalueerd met behulp van K2EDTA anti-gecoaguleerd volbloed. In totaal werden tijdens het onderzoek 14 bloedmonsters gebruikt; twee waren wild-type, terwijl de overige monsters unieke genotypen hadden die negen verschillende varianten vertegenwoordigden, waaronder zowel veelvoorkomende als zeldzame varianten. Voor de polyTG/polyT-variantie waren monsters met (T)5-9 en (TG)10-12 opgenomen. De drie DNA-extractiemethoden werden onafhankelijk getest door twee verschillende operators die elk drie runs per extractiemethode uitvoerden. Elke extractie werd door elke operator op verschillende dagen uitgevoerd. De DNA-concentratie en A260/A280-verhouding van de geëxtraheerde gDNA-monsters werd bepaald met behulp van spectrofotometrie. De totale monsterbatchgrootte voor elke extractiemethode in dit onderzoek was 168 (14 monsters x 2 operators/extractiemethode x 3 runs/operator x 2 replicaten/geëxtraheerd gDNA-monster).

Extractiemethode	Aantal geteste monsters	Bepalingspercentage	Nauwkeurigheid	Percentage monsters eerste keer geslaagd*
Alcoholprecipitatie	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Silicafilterkolomisolatie	168	> 99,99%	> 99,99%	100%
Magnetische-parextractie	168	> 99,99%	> 99,99%	100%

\* Percentage monsters met een bepalingpercentage van > 99% tijdens de eerste run.

## DNA-input

Het DNA-inputbereik van de Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay werd geëvalueerd door een seriële verdunningsstudie uit te voeren met 14 representatieve DNA-monsters die 16 unieke CF-varianten bevatten.

Elk monster werd dubbel getest op negen DNA-inputniveaus, variërend van 1250 – 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng en 1 ng). Voor het bepalen van de nauwkeurigheid werden monstergenotypen vergeleken met de gegevens van de bidirectionele Sanger-sequencing en werden de deleties vergeleken met PCR-analyse. De inputniveaus 1250 ng en 25 ng werden geïdentificeerd als de respectievelijke boven- en ondergrens voor DNA-input, omdat ze een slagingspercentage tijdens de eerste run hadden van  $\geq 95\%$  zonder onjuiste bepalingen (100% nauwkeurigheid en bepalingpercentage).

DNA-inputs van 1250 ng, 250 ng en 100 ng werden verder getest met vier representatieve DNA-monsters en ten minste 20 replicaten per DNA-inputniveau voor elk monster ( $n=4 \times 20=80$  monsters), terwijl de ondergrens van 25 ng werd getest met 14 monsters en 20 replicaten voor elk monster ( $n=14 \times 20=280$  monsters). De nauwkeurigheid en het slagingspercentage voor monsters tijdens de eerste run was 100% op alle DNA-inputniveaus.

## Interfererende stoffen

Om de impact van interfererende stoffen op het Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis System te beoordelen, werden de prestaties van de assay beoordeeld in aan- en afwezigheid van mogelijk interfererende stoffen. Voor het onderzoek werden 16 volbloedmonsters met unieke CF-genotypen getest. Vier endogene interfererende stoffen (bilirubine, cholesterol, hemoglobine en triglyceride) werden getest door ze voorafgaand aan de DNA-extractie aan bloedmonsters toe te voegen. De concentratielimiten voor elke stof worden vermeld in de volgende tabel. Om de interferentie als gevolg van bloedafname (korte afname) te beoordelen, werd bovendien EDTA toegevoegd aan bloedmonsters, en om interferentie als gevolg van monstervoorbereiding te beoordelen, werd de laatste wasbuffer van een silicafilterkolomisolatiemethode toegevoegd aan gezuiverd genomisch DNA.

De Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay behaalde een bepalingpercentage van 100% voor alle geteste monsters, en een reproduceerbaarheid 100% in genotypebepalingen tussen monsters in aan- en afwezigheid van interfererende stoffen. Er werd geen interferentie waargenomen van een van de endogene of exogene interfererende stoffen.

Om het effect van multiplexing-indexprimerinterferentie te beoordelen, werd een kruisbesmettingsonderzoek uitgevoerd met twee monsters, elk met unieke homozygote genotypen op vier verschillende genomische posities, en twee respectieve indexprimers. Bij contaminatieniveaus van < 40% werd geen verandering in de variantbepaling waargenomen. Het monstergenotype werd heterozygoot wanneer de contaminatieniveaus  $\geq 40\%$  waren.

Teststof	Totaal aantal replicaten	Concentratie getest in bloed (bovengrens)	Concentratie getest in bloed (ondergrens)	Bepalingspercentage
Bilirubine	16	684 $\mu\text{mol/l}$	137 $\mu\text{mol/l}$	100%
Cholesterol	16	13 $\text{mmol/l}$	2,6 $\text{mmol/l}$	100%
Hemoglobine	16	2 $\text{g/l}$	0,4 $\text{g/l}$	100%
Triglyceride	16	37 $\text{mmol/l}$	7,4 $\text{mmol/l}$	100%
EDTA	16	7,0 $\text{mg/ml}$	2,8 $\text{mg/ml}$	100%

## Prestatie-equivalentie met Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

De TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (TruSight CFCS) gebruikt dezelfde workflow en reagentia voor bibliotheekvoorbereiding als de Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Assay (MiSeqDx CFCS). TruSight CFCS gebruikt de MiSeqDx Reagent Kit v3. De MiSeqDx CFCS maakt gebruik van sequencing-reagentia die bij de assay worden geleverd. Om de gelijkwaardigheid tussen TruSight CFCS en MiSeqDx CFCS aan te tonen, werden de resultaten van negen TruSight CFCS-runs vergeleken met een enkele MiSeqDx CFCS-run als gouden standaard. De TruSight CFCS-runs werden uitgevoerd met een doorvoer van 96 monsters (maximale monsterdoorvoer voor TruSight CFCS). De MiSeqDx CFCS-runs werden uitgevoerd met een doorvoer van 48 monsters (maximale monsterdoorvoer voor MiSeqDx CFCS). De bronnen van variabiliteit

opgenomen in TruSight CFCS-runs omvatten drie bibliotheekvoorbereidingsgebeurtenissen (elk met een unieke partij TruSight Cystic Fibrosis), drie operators, drie MiSeqDx-instrumenten en drie partijen van de MiSeqDx Reagent Kit v3.

De variantbepalingen van de TruSight CFCS-runs werden vergeleken met bepalingen van de MiSeqDx CFCS-run. In elke TruSight CFCS-run werden 47 unieke monsters opgenomen, met 2-3 replicaten per monster (95 DNA-monsters en 1 NTC per run). Voor de MiSeqDx CFCS-run werden dezelfde 47 monsters gesequencet als singleton (47 DNA-monsters + 1 NTC per run). Het monsterpanel bestond uit Coriell DNA-monsters die uit geïmmortaliseerde cellijnen werden geëxtraheerd, en omvatte monsters die elk allel van de ACMG 23-mutaties vertegenwoordigden.<sup>1</sup> Het panel omvatte varianten van deletie-insertie (inclusief deletie-insertie in homopolymere gebieden en insertie-met-deletie in hetzelfde gebied). Het panel omvatte ook homozygote varianten, samengestelde heterozygote varianten en een van de gerichte grote deleties. Het omvatte ook PolyTG/PolyT-varianten, enkele nucleotidevarianten en een monster zonder gedetecteerde varianten. Een samenvatting van de resultaten per genotype is te vinden in [Tabel 26](#). De overeenkomst tussen assays per varianttype wordt weergegeven in [Tabel 27](#). De algehele (totale) overeenkomst tussen assays was > 99,99%.

**Tabel 26** De variantbepalende prestaties van TruSight CFCS-variant assay vergeleken met MiSeqDx CFCS-variant assay

		MiSeqDx CF Clinical Assay				Totaal
		Hom-variant	Het-variant	Wild-type	Niet-bepaling	
<b>TruSight CF Clinical Assay</b>	Hom-variant	551	-	-	-	551
	Het-variant	-	2.664	-	-	2.664
	Wild-type	-	-	4.426.182	-	4.426.182
	Niet-bepaling	-	-	58	-	58
	Totaal	551	2.664	4.426.420	-	4.429.455

**Tabel 27** Prestaties per varianttype van TruSight CF Clinical Sequencing Assay vergeleken met MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay

Varianttype	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	Overeenkomst met MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay
SNV	2.684	0	0	100,00% (2.684/2.684)
DEL	18	0	0	100,00% (18/18)
DIV	513	0	0	100,00% (513/513)

Varianttype	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	Overeenkomst met MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay
PolyTG/PolyT	847	1	3	99,88% (847/851)
Geen (wild-type)	4.426.182	0	58	100,00% (4.426.182/4.426.240)
Totaal	4.430.244	1	61	> 99,99% (4.430.244/4.430.306)

Er werd een enkele dissonante bepaling waargenomen tussen TruSight CFCS en MiSeqDx CFCS. De specifieke onjuiste bepaling was een PolyTG/PolyT-variant. Een samenvatting van de PolyTG/PolyT-concordantie is te vinden in [Tabel 28](#).

**Tabel 28** De PolyTG/PolyT-variant bepalende prestaties van TruSight CF Clinical Sequencing Assay vergeleken met MiSeqDx CF Clinical Sequencing Assay

		Tabel MiSeqDx CF Clinical Assay											Niet-bepaling	Totaal
		(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		
TruSight CF Clinical Assay	(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
	Niet-bepaling	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
<b>Totaal</b>	<b>50</b>	<b>189</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>72</b>	<b>18</b>	<b>126</b>	<b>252</b>	<b>72</b>	<b>36</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>851</b>	

## Referenties

1. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in Medicine* 6 (5): 387–391.
2. Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.
3. Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
4. Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genetics in Medicine* 10(12):851–868.
5. Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): Universiteit van Washington; 2008. Beschikbaar via [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250). [Online] Bijgewerkt 19 februari 2008.
6. Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Beschikbaar op [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). [Online] 7 december 2012.
7. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153 (2):S4–S14.
8. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
9. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Beschikbaar op [www.genet.sickkids.on.ca/app](http://www.genet.sickkids.on.ca/app). [Online] Augustus 2013.
10. Rohlf EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*; 57(6): 841–848.
11. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Beschikbaar op [www.cftr2.org](http://www.cftr2.org). [Online] Augustus 2013.
12. The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Beschikbaar op [www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf](http://www.nacconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf). [Online] Gepresenteerd door Garry Cutting namens het CFTR2-project tijdens de 25e jaarlijkse North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC), gesponsord door de Cystic Fibrosis Foundation. 4 november 2011. Anaheim, CA.
13. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature Genetics* 45 (10): 1160–1167.
14. Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (maart/april 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.
15. Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr., Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7:179–196.

16. Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (mei 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. *Journal of Molecular Diagnostics* 11(3): 186–193.
17. Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (editie 2008, herzien 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
18. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genetics in Medicine*. *Genetics in Medicine* 15(9): 733–747.

## Revisiegeschiedenis

Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 1000000097720 v04	Oktober 2023	<ul style="list-style-type: none"><li>• Catalogusnummer van de MiSeqDx Reagent Kit v3 bijgewerkt.</li><li>• Catalogusnummers van kits toegevoegd aan het gedeelte Reagentia.</li><li>• Waarschuwingssymbool verwijderd uit Opmerkingen en Waarschuwingen.</li><li>• Het gebruik van de MiSeqDx v3 Reagent Kit ten opzichte van de MiSeqDx v3 Reagent Kit Micro is overal verduidelijkt.</li><li>• Verduidelijking van de waarschuwing onder het gedeelte Verwijdering van niet-gebonden oligonucleotiden, om ervoor te zorgen dat de centrifuge vóór elk gebruik op de juiste wijze wordt gekoeld.</li><li>• Verklaring inzake handelsmerk verwijderd ten gunste van de URL waar specifieke octrooien kunnen worden doorzocht.</li><li>• CE-markering bijgewerkt met nummer van de aangemelde instantie en EC REP-adres met importsymbool.</li></ul>



Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 1000000097720 v03	Mei 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhoud van het hele document bijgewerkt in verband met de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (catalogusnr. 20063860) en de bijbehorende workflow.</li> <li>• Subsectie voor monstervoorbereiding aangemaakt in het gedeelte Procedurele opmerkingen en de informatie over DNA-extractie en kwantificering naar deze subsectie verplaatst.</li> <li>• Waarschuwing en voorzorgsmaatregelen toegevoegd voor het melden van ernstige incidenten in verband met dit product aan Illumina en de bevoegde autoriteit van de lidstaat.</li> <li>• Samenvatting van de veiligheids- en prestatiegegevens met UDI-DI Basic toegevoegd aan de sectie Productlabeling.</li> <li>• Plaatsing van het ™-symbool in productoverzicht gecorrigeerd.</li> <li>• Pictogrammen voor Opmerking, Let op en Waarschuwing bijgewerkt.</li> <li>• Revisiegeschiedenistabel aangevuld.</li> </ul>
Documentnr. 1000000097720 v02	Augustus 2021	Adres gemachtigde vertegenwoordiger voor de EU bijgewerkt.
Documentnr. 1000000097720 v01	Juni 2020	Nieuw onderdeelnummer 20037124 voor de MiSeqDx Reagent Kit v3 toegevoegd.
Documentnr. 1000000097720 v00	Maart 2020	Eerste uitgave.

## Octrooien en handelsmerken

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

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

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

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

© 2023 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

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

## Contactgegevens



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



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

**Australische sponsor**

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

## Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die mogelijk worden weergegeven op de verpakkingen en labels van de producten het symbooloverzicht voor uw kit via [support.illumina.com](https://support.illumina.com).

Een samenvatting van veiligheid en prestaties (SSP) is te vinden op <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>. Start daarvoor de Europese database voor medische hulpmiddelen (Eudamed). Deze is gekoppeld aan de Basic UDI-DI (0081627002CYSTFIB8C).