

ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗНОС.

Предназначение

Инструментът MiSeqDx е предназначен за целево секвениране на ДНК библиотеки от човешка геномна ДНК, извлечена от периферна цяла кръв или фиксирана във формалин и вградена в парафин (FFPE) тъкан, когато се използва при *in vitro* диагностични (IVD) анализи, извършени на инструмента. Инструментът MiSeqDx не е предназначен за цялостен геном или *de novo* секвениране. Инструментът MiSeqDx трябва да се използва с регистрирани и описани, позволени или одобрени IVD реактиви и аналитичен софтуер.

Принципи на процедурата

Illumina MiSeqDx е предназначен за целево повторно секвениране на човешка ДНК с помощта на консумативи за секвениране и библиотеки на Illumina, приготвени от човешка геномна ДНК, извлечена от периферна цяла кръв или FFPE тъкан, използвайки регистрирани и описани, позволени или одобрени IVD реагенти. Библиотеките се подготвят чрез амплифициране на целите и добавяне на индекси на проби и секвенции за заснемане. Библиотеките с проби се заснемат върху поточна клетка и се секвенират на инструмента, като се използва секвениране чрез синтезна (SBS) химия. SBS химията използва обратим метод за прекратяване на удължаването за откриване на единични нуклеотидни бази, тъй като те са включени в нарастващи ДНК вериги. Софтуерът Real-Time Analysis (RTA) извършва анализ на изображения и обозначаване на бази и назначава резултат за качество на всяка база за всеки цикъл на секвениране. Когато първичният анализ приключи, вторичният анализ на инструмента MiSeqDx обработва обозначавания на бази.

Обработването обикновено включва демултиплексиране, генериране на FASTQ файлове, подравняване, обозначаване на вариант и генериране на файлове за обозначаване на вариант (VCF), съдържащи информация за варианти, намерени на конкретни позиции в референтен геном. MiSeqDx използва различни модули за вторичен анализ в зависимост от работния процес.

Конфигурация на двойно зареждане

Конфигурацията на двойно зареждане включва хардуер, софтуер и процедури за инсталиране, които позволяват на инструмента MiSeqDx да изпълнява анализи на секвениране както за *in vitro* диагностика (IVD), така и само за изследователска употреба (RUO). Конфигурацията на двойно зареждане позволява на потребителя да превключи между диагностичен режим на инструмента и изследователски режим на

инструмента. Радиочестотните идентификации (РЧИД) на консумативите за секвениране предотвратяват използването на реагентите за секвениране за RUO в изпълнявания на диагностично секвениране.

Ограничения на процедурата

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Резултатите, представени на етикета, са получени с представителни аналитични панели, използващи периферна цяла кръв или клетъчни линии за производителност на герминативна линия и FFPE тъкан или FFPE клетъчни линии за соматична производителност с описаните реагенти и софтуерни модули. Модулите за вариант на герминативна линия и соматичен вариант са разработени с цел оценка на ефективността с представителни анализи. Характеристиките за производителност се предоставят само за информативни цели. Представените тестове за валидиране служат само за илюстриране на общите възможности на инструмента и не установяват възможностите или годността на инструмента по отношение на никакви конкретни претенции. Всички диагностични тестове, разработени за използване на този инструмент, изискват пълна проверка за всички аспекти на работата.
- Този продукт е ограничен до предоставяне на следните:
 - Изходни данни от секвенирането ≥ 5 Gb при дължина на разчитане 2 x 150 bp
 - Филтър за преминаване на разчитания ≥ 15 милиона при дължина на разчитане 2 x 150 bp
 - Бази, по-високи от Q30 $\geq 80\%$ при дължина на разчитане 2 x 150 bp
Бази равни или по-големи от 80% имат резултат за качество по скалата на Phred над 30, включително точност на обозначаване на бази над 99,9%
- Инструментът MiSeqDx е валидиран само за секвениране на човешки ДНК библиотеки, извлечени от периферна цяла кръв или FFPE тъкан. Библиотеките, генерирани от други типове материали за изследване, не трябва да се използват с този инструмент за *in vitro* диагностична употреба. Производителността на този инструмент за секвениране на микробни или вирусни нуклеинови киселини от клинични материали за изследване не е установена.
- MiSeqDx е предназначен за *in vitro* диагностична употреба с регистрирани и описани, позволени или одобрени IVD реактиви или анализи. Ограниченията на реактивите и характеристиките на производителност, описани в тази листовка, се основават на представителни анализи и софтуерни модули. За IVD анализи вижте специфичната за анализа листовка за предназначение, открити варианти и тип проба.
- Съдържание на индели (инсерции, делеции и комбинации от тях) с дължина по-голяма от 25 bp не са подравнени от софтуера за анализ. Следователно инделите с дължина по-голяма от 25 bp не могат да бъдат открити от софтуера за анализ.

- Системата е валидирана за откриване на еднуклеотидни варианти (SNV) и до делеции с 25 bp и инсерции с 24 bp, когато се използва със софтуера за модула за вариант на герминативна линия и соматичен вариант). За соматично обозначаване при вариантна честота 0,05 бяха открити делеции с 25 bp и инсерции с 18 bp.
- Разчитането на ампликони с изключително съдържание на варианти може да не бъде подравнено от софтуера за анализ, в резултат на което регионът се отчита като див тип. Такова изключително съдържание включва:
 - Разчитания, съдържащи повече от три индела.
 - Разчитания с дължина най-малко 30 bp със съдържание на SNV, по-голямо от 4% от общата дължина на ампликона (без регионите на сондата).
 - Разчитания с дължина по-малка от 30 bp със съдържание на SNV, по-голямо от 10% от общата дължина на ампликона (включително регионите на сондата).
- Големи варианти, включително многонуклеотидни варианти (MNV) и големи индели, могат да бъдат докладвани като отделни по-малки варианти в изходния VCF файл.
- Вариантите на делеции могат да бъдат филтрирани или пропуснати, когато обхващат два ампликона с плочки, ако дължината на делецията е по-голяма или равна на припокриването между ампликоните с плочки.
- Системата не може да открие индели, ако се появят в непосредствена близост до праймер и няма припокриващ се ампликон. За региони с припокриващи се ампликони анализът не може да открие делеции, когато регионът на припокриване е по-малък от размера на делецията, която трябва да бъде открита. Например, ако областта на припокриване между два съседни ампликона е две (2) бази, анализът не може да открие никакви делеции, включително и двете от тези бази. Може да се открие делеция на една база в която и да е от тези бази.
- Както при всеки работен процес за приготвяне на библиотека, базиран на хибридизация, основните полиморфизми, мутации, инсерции или делеции в региони, свързващи олигонуклеотиди, могат да повлияят на изследваните алели. Следователно обозначаванията, направени по време на секвенирането, също се повлияват. Например:
 - Вариант във фаза с вариант в региона на праймера може да не се амплифицира, което води до фалшиво отрицателен резултат.
 - Вариантите в региона на праймера могат да предотвратят амплифицирането на референтния алел, което води до неправилно обозначаване на хомозиготен вариант.
 - Вариантите на индели в региона на праймера може да причинят фалшиво положително обозначаване в края на разчитането в съседство с праймера.
- Инделите могат да бъдат филтрирани поради отклонение на верига, ако се появят в края на едно разчитане и са изрязани по време на подравняването.
- Малки MNV не са валидирани.
- Вариантите на броя копия или структурните варианти, като сливания или транслокации, не са валидирани.

- Специфични ограничения за герминативна линия:
 - Системата MiSeqDx, използваща модула за вариант на герминативна линия, е проектирана да осигури качествени резултати за обозначаване на вариант на герминативна линия (т.е. хомозиготен, хетерозиготен, див тип).
 - Когато се използва с модула за вариант на герминативна линия, минималното покритие на ампликон, необходимо за точното обозначаване на вариант, е 150x. Броят на пробите и общият брой целеви бази влияят върху покритието. Съдържанието на гуанин-цитозин и друго геномно съдържание могат да повлияят на покритието.
 - Варирането на броя копия може да повлияе на това дали вариантът е идентифициран като хомозиготен или хетерозиготен.
 - Вариантите в определен повтарящ се контекст се филтрират във VCF файловете. Филтърът за повторения RМxN се използва за филтриране на варианти, ако цялата или част от секвенциите на вариантите присъства многократно в референтния геном, съседен на позицията на варианта. Изискват се поне 9 повторения в препратката за обозначаване на вариант на герминативна линия и се вземат предвид само повторения с дължина до 5 bp (R5x9).
- Специфични ограничения за соматичен вариант:
 - Системата MiSeqDx, използваща модула за соматичен вариант, е проектирана да доставя качествени резултати за обозначаване на соматични варианти (т.е. наличие на соматичен вариант с вариантна честота, която е по-голяма или равна на 0,026 с граница на откриване 0,05).
 - Когато се използва с модула за соматичен вариант, минималното покритие на ампликон, необходимо за точното обозначаване на вариант, е 450x за олигонуклеотидно обединяване. Броят на пробите и общият брой целеви бази влияят върху покритието. Съдържанието на гуанин-цитозин и друго геномно съдържание могат да повлияят на покритието.
 - Вариантите в определен повтарящ се контекст се филтрират във VCF файловете. Филтърът за повторения RМxN се използва за филтриране на варианти в цялата или част от секвенциите на вариантите и присъства многократно в референтния геном, съседен на позицията на варианта. Изискват се поне 6 повторения в препратката за обозначаване на соматичен вариант и се вземат предвид само повторения с дължина до 3 bp (R3x6).
 - Модулът за соматичен вариант не може да разграничава варианти на герминативна линия и соматични варианти. Модулът е предназначен да открива варианти в диапазон от вариантни честоти, но вариантната честота не може да се използва за разграничаване на соматичните варианти от вариантите на герминативна линия.
 - Нормалната тъкан в материала за изследване влияе върху откриването на варианти. Отчетената граница за откриване се основава на вариантната честота спрямо общата ДНК, извлечена както от тумор, така и от нормална тъкан.

Компоненти на продукта

Illumina MiSeqDx се състои от следното:

MiSeqDxИнструмент (Каталожен № DX-410-1001)

Следните софтуерни компоненти се изискват за MiSeqDxанализа на работата и данните на инструмента:

Софтуерно приложение	Функция	Описание
MiSeq Operating Software (MOS)	Контролира работата на инструмента	Софтуерното приложение MOS управлява работата на инструмента по време на секвениране и генерира изображения за употреба от софтуера Real-Time Analysis (RTA). За повече информация вижте <i>Наръчник за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4 (документ № 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Изпълнява основен анализ	Софтуерното приложение RTA преобразува изображенията, генерирани от MOS, за всяка плочка за цикъл на изпълняване на секвениране във файлове за обозначаване на бази, които са входове за модулите за анализ на Local Run Manager. Софтуерното приложение RTA не съдържа потребителски интерфейс.
Local Run Manager	Интерфейс за избиране на модул	Софтуерът Local Run Manager е интегрирано решение на инструмента за управление на потребителя, изпълняване на вторичен анализ и мониторинг на състоянието. За повече информация вижте <i>Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx (Справочно ръководство за софтуера Local Run Manager v4 за MiSeqDx) (документ № 200046657)</i> .

Съхранение и обработка

Елемент	Спецификация
Температура	Транспорт и съхранение: -10°C до 40°C (14°F до 104°F) Условия на работа: 19°C до 25°C (66°F до 77°F)
Влага	Транспорт и съхранение: Некондензираща влажност Условия на работа: 30 – 75% относителна влажност (некондензираща)

Необходимо оборудване и материали, не са предоставени

Консумативи за секвениране

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Каталожен № 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Каталожен № 20063860)

Консумативи, които се набавят от потребителя

Уверете се, че следните консумативи, които се набавят от потребителя, са налични преди започване на изпълняване.

Консуматив	Цел
Кърпички със спирт, 70% изопропилов или Етанол, 70%	Почистване на стъклото и площадката на поточната клетка
Лабораторни кърпи, ниска степен на отделяне на мъх	Почистване на платформата на поточната клетка
Хартия за лещи, 4 x 6 in	Почистване на поточната клетка

Консуматив	Цел
Tween 20	Измиване на инструмента
Пинсети, пластмаса с квадратна форма (незадължително)	Премахване на поточната клетка от контейнера за транспортиране на поточна клетка
Вода, лабораторен клас	Измиване на инструмента

Насоки за лабораторен клас вода

Винаги използвайте лабораторен клас вода или дейонизирана вода за извършване на процедури по инструмента. Никога не използвайте чешмяна вода.

Използвайте само следните класове вода или еквиваленти:

- Дейонизирана вода
- Illumina PW1
- 18 мегаома (MΩ) вода
- Milli-Q вода
- Super-Q вода
- Клас вода за молекулярна биология

Предупреждения и предпазни мерки



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Този набор от реактиви съдържа потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Вентилацията трябва да е подходяща за работа с опасни материали в реактивите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реактиви като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За допълнителна информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте ИЛБ на адрес support.illumina.com/sds.html.

- Работете с всички кръвни проби така, сякаш е известно, че са заразни за човешкия имунодефицитен вирус (ХИВ), вируса на човешкия хепатит В (ХБВ) и други патогени, пренасяни в кръвта (универсални предпазни мерки).
- Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на пробата.
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с материали за изследване и комплекти с реагенти. Измийте внимателно ръцете си след работа с материали за изследване и комплекти с реагенти.

- Необходими са подходящи лабораторни практики и добра лабораторна хигиена, за да се предотврати замърсяването на продуктите от PCR с реагенти, апаратура и геномни ДНК проби. Замърсяването с PCR може да доведе до неточни и ненадеждни резултати.
- За да предотвратите замърсяване, се уверете, че предамплификационните и следамплификационните зони разполагат със специално оборудване и консумативи (напр. пипети, накрайници за пипети, термоблокове, завихрящи миксери и центрофуги).
- Когато е уместно, сдвояването на индексната проба трябва да съответства точно на оформлението на отпечатаната плака. Local Run Manager автоматично попълва индексните праймери, свързани с имената на пробите, когато е въведено в модула. Съветваме потребителя да провери индексните праймери, свързани с проби, преди да започне изпълняването на секвениране. Несъвпаденията между пробата и оформлението на плочата водят до загуба на положителна идентификация на пробата и неправилно отчитане на резултатите.
- Инсталирането на осигурен от потребителя антивирусен софтуер е силно препоръчително за защита на компютъра от вируси. Направете справка с ръководството на потребителя за инструкции относно инсталирането.
- Не работете с MiSeqDx, ако който и да е от панелите му е премахнат. Ако използвате инструмента, докато някой от панелите е премахнат, това може да доведе до излагане на линейно напрежение и постоянно токови напрежения.
- Не докосвайте станцията на поточната клетка в отделението за поточни клетки. Нагревателят в това отделение работи между 22°C и 95°C и може да доведе до изгаряния.
- Инструментът тежи приблизително 57 kg (126 lbs) и може да причини сериозни наранявания при изпускане или неправилно боравене.
- Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентния орган на държавата членка, в която са установени потребителят и/или пациентът.

Инструкции за употреба

Следните инструкции за употреба на инструмента MiSeqDx изискват реагенти, предоставени в MiSeqDx Reagent Kit v3.

Създаване на изпълняване с Local Run Manager

За подробни инструкции за създаване на изпълняване вижте ръководството за *Local Run Manager v4 Software Guide for MiSeqDx* (Справочно ръководство за софтуера Local Run Manager v4 за MiSeqDx) (документ № 200046657) и модула Local Run Manager за модула за анализ, който използвате.

Приготвяне на касетата с реагенти

Следващите инструкции описват как се размразяват реагентите на водна баня при стайна температура.

1. Извадете касетата с реагенти от мястото на съхранение при температура от -15°C до -25°C .
2. Поставете касетата с реагенти във водна баня, съдържаща достатъчно количество дейонизирана вода със стайна температура, за да потопите основата на касетата с реагенти до линията за ниво на водата, отпечатана на касетата с реагенти. Не позволявайте на водата да надвишава линията за максимално ниво на водата.

Фигура 1 Линия за максимално ниво на водата



3. Оставете касетата с реагенти да се размрази на водната баня на стайна температура за приблизително 60 – 90 минути или докато се размрази напълно.
4. Извадете касетата от водната баня и внимателно я почукайте върху масата, за да изхвърлите водата от основата на касетата. Изсушете основата на касетата. Уверете се, че по горната част на касетата с реагенти не е пръснала вода.

Проверяване на касетата с реагенти

1. Обърнете касетата с реагенти десет пъти, за да смесите размразените реактиви и след това проверете дали всички позиции са размразени.
2. Проверете реагентите в позиции 1, 2 и 4, за да се уверите, че те са напълно смесени и без утайки.

ЗАБЕЛЕЖКА От решаващо значение е реагентите в касетата да се размразят добре и да се смесят, за да се осигури правилно секвениране.

3. Внимателно почукайте касетата върху масата, за да намалите въздушните мехурчета в реагентите.

ЗАБЕЛЕЖКА Сиперните тръбички на MiSeqDx отиват на дъното на всеки резервоар, за да аспирират реагентите, така че е важно резервоарите да нямат въздушни мехурчета.

4. Поставете касетата с реагенти върху лед или оставете настрана при 2°C до 8°C (до шест часа), докато сте готови за конфигуриране на изпълняването. За най-добри резултати продължете директно към зареждане на пробата и настройка на изпълняването.

Приготвяне на проби за секвениране

За указания как да пригответе библиотеки с проби за секвениране, включително разреждане и обединяване на библиотеки, вижте раздела с инструкции за употреба в листовката за приготвяне на библиотеки.

Разреждането на библиотеки с проби е зависимо от комплексността на олигонуклеотидни обединявания. Необходима е оптимизация на клъстерната плътност на MiSeqDx, а оптималната плътност на клъстерите варира в зависимост от конкретния анализ за приготвяне на библиотеки.

Зареждане на библиотеки с проби на касетата

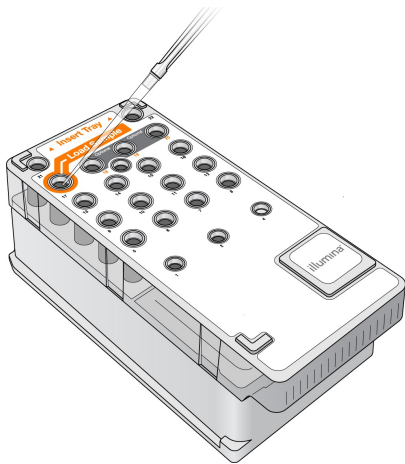
Когато касетата с реагенти е напълно размразена и готова за употреба, може да заредите проби в касетата.

1. Използвайте отделен, чист и празен накрайник за пипета от 1 ml за пробиване на фолиевото запечатване на резервоара на касетата с реагенти с етикет **Load Samples** (Зареждане на проби).

ЗАБЕЛЕЖКА Не пробивайте никаква друга позиция на реагента. Другите позиции на реагента се пробиват автоматично по време на изпълняване.

2. Пипетирайте 600 µl от подготвените библиотеки с проби с разреден ампликон (DAL) в резервоара **Load Samples** (Зареждане на проби). Избягвайте докосването на фолиевото запечатване.
3. Проверете за въздушни мехурчета в резервоара след зареждане на пробата. Ако има въздушни мехурчета, леко почукайте касетата върху масата, за да освободите мехурчетата.

Фигура 2 Зареждане на библиотеки



4. Продължете директно към стъпките за конфигуриране на изпълняването, като използвате интерфейса на MiSeq Operating Software (MOS).

Конфигуриране на изпълняване

Вижте *Наръчник за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4 (документ № 200010452)* за пълни инструкции за настройка на изпълняването.

1. Влезте в MiSeqDx с вашата парола за софтуера Local Run Manager.
2. От екрана Home (Начало) на софтуера MOS изберете **Sequence** (Секвениране).

- Изберете изпълняване от списъка, след което изберете **Next** (Напред).
Серия от екрани за настройка на изпълняване се отваря в следния ред: Зареждане на поточна клетка, зареждане на реактиви, преглед и проверка преди изпълняване.
- Когато се появи екранът Load Flow Cell (Зареждане на поточна клетка), почистете и след това заредете поточната клетка.
- Затворете ключалката на поточната клетка и вратичката на отделението за поточни клетки.
Както ключалката, така и вратичката на отделението трябва да бъдат затворени преди започване на изпълняването. Когато поточната клетка е заредена, софтуерът разчита и записва радиочестотна идентификация (РЧИД). В долния десен ъгъл на екрана се появява потвърждение, че РЧИД е прочетен успешно.
- Следвайте подканите на софтуера, за да заредите бутилката с разтвор MiSeqDx SBS (PR2), уверете се, че бутилката за отпадъци е празна и заредете касетата с реагенти.
Когато се заредят бутилката с разтвор MiSeqDx SBS (PR2) и касетата с реагенти, софтуерът разчита и записва РЧИД. В долния десен ъгъл на екрана се появява потвърждение, че РЧИД е прочетен успешно.
- Екранът Sequencing (Секвениране) се отваря, когато изпълняването започне. Този екран осигурява визуално представяне на текущото изпълняване, включително интензивност и резултати за качество.

Резултати

Real-Time Analysis (RTA) е интегриран софтуер, който извършва анализ на изображения и обозначаване на бази и назначава резултат за качество на всяка база за всеки цикъл на секвениране. Когато първичният анализ приключи, модулът на инструмента MiSeqDx, избран в [Създаване на изпълняване с Local Run Manager на стр. 7](#), започва вторичен анализ. Вижте специфичната за анализа документация за други работни потоци.

Процедури за качествен контрол

Софтуерът MiSeqDx оценява всяко изпълняване, проба и обозначаване на бази спрямо измерванията за контрол на качеството. Когато се изисква, положителните и отрицателните контроли, включени в приготвянето на библиотеката, също трябва да бъдат оценени за очаквани резултати.

Функционални характеристики

Всички проучвания бяха изпълнени на MiSeqDx.

Изследванията за герминативна линия използваша или анализа на 139 варианта на кистична фиброза MiSeqDx, или реагенти на комплект за персонализиран ампликон TruSeq Dx за приготвяне на библиотека. Двата комплекта използват идентични реагенти за приготвяне на библиотеки и имат само

една разлика в работния процес: броят на циклите на полимеразна верижна реакция (PCR) (съответно 25 и 28). Допълнителните PCR цикли позволяват по-нисък ДНК вход с комплекта за персонализирани ампликони TruSeq Dx (50 ng) в сравнение с анализа на 139 варианта на кистична фиброза MiSeqDx (250 ng), както е показано в проучването за ДНК вход чрез комплекта за персонализирани ампликони TruSeq Dx. Библиотеките, приготвени с анализа на 139 варианта на кистична фиброза MiSeqDx, бяха секвенирани с придружаващите реагенти за секвениране в комплекта. Библиотеките, приготвени с комплекта TruSeq Custom Amplicon Dx, бяха секвенирани с комплект с MiSeqDx Reagent Kit v3. Последните реагенти за секвениране са увеличили продукцията спрямо тези в анализа на 139 варианта на кистична фиброза MiSeqDx.

Тестването обхваща диапазоните на пропускателна способност, поддържани от MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx може да поддържа 1 – 96 проби/изпълнявания в зависимост от анализа. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro е предназначен да поддържа по-ниска пропускателна способност в рамките на диапазона за избрани анализи.

Проучванията за соматичен вариант използват комплект TruSeq Custom Amplicon Dx с MiSeqDx Reagent Kit v3.

Работните процеси за герминативна линия и за соматичен вариант, описани за комплекта за персонализирани ампликони TruSeq Dx за приготвяне на библиотеки за секвениране, бяха последвани от анализ чрез модула за вариант на герминативна линия или модула за соматичен вариант, съответно, с две изключения. Проучванията, използващи един ген (производителност на герминативна линия; анализ на 139 варианта на кистична фиброза MiSeqDx) или два гена (производителност на соматичен вариант) като представителни мутационни панели, използваха специфични за анализа работни процеси и модули за анализ.

ЗАБЕЛЕЖКА Геномното съдържание на ампликон е обобщено спрямо геномната верига, която е секвенирана. За ампликони, проектирани срещу минусовата верига, съдържанието на референтния геном е обратното комплементно (например ПолиА регионите на ампликоните с минусова верига съответстват на ПолиТ регионите на референтния геном).

Определения на изчисленията, използвани в характеристиките на производителността

- Положителното процентно съответствие (PPA) се изчислява като дела на локусите, класифицирани като варианти чрез референтен метод, които са правилно докладвани от анализа.
 - $(\text{брой локуси на варианти, правилно отчетени от анализа}) / (\text{общ брой локуси на варианти})$
Локуси на варианти, докладвани от анализа, които съответстват на референтния метод, са действително положителни резултати (TP). Локуси на варианти, отчетени като референтни обозначавания или като различни обозначавания на варианти от анализа, са фалшиво отрицателни (FNs).

- Отрицателното процентно съответствие (PPA) се изчислява като дела на локусите, класифицирани като див тип чрез референтен метод, които са правилно докладвани от анализа.
 - $(\text{брой локуси от див тип, правилно отчетени от анализа}) / (\text{общ брой от локуси от див тип})$
Локусите от див тип, отчетени от анализа, които съответстват на референтния метод, са действително отрицателни резултати (TN). Локусите от див тип, съобщени като варианти от анализа, са фалшиво положителни (FPs).
- Общото процентно съответствие (OPA) се изчислява като делът на локусите, правилно отчетени от анализа спрямо референтен метод.
 - $((\text{брой локуси на варианти, правилно отчетени от анализа}) + (\text{брой локуси от див тип, правилно отчетени от анализа})) / ((\text{общ брой локуси на вариант}) + (\text{общ брой на локуси от див тип}))$
- За приложения за обозначаване на варианти изчисленията на PPA, NPA и OPA не включват състояния без обозначавания (локуси на вариант или референтни локуси, които не отговарят на един или повече филтри за качество). Две проучвания конкретно включват състояния без обозначавания в тяхното измерване „% правилни обозначавания“ и това включване на състояния без обозначавания се отбелязва за приложимите таблици.
- Честотата на обозначавания се изчислява като общ брой локуси, преминаващи филтрите, разделен на общия брой позиции, секвенирани за хромозоми 1 – 22. Хромозомите X и Y са изключени. Това измерване не отчита съответствието на обозначаванията с референтния метод.

За характеристики на производителността, свързани с фактори преди анализа (например методи за екстракция или въвеждане на ДНК), вижте листовката за приложимия метод за приготвяне на библиотеката.

Индексиране на проби

Индексните праймери на проби, добавени по време на приготвяне на библиотека, назначават уникална секвенция на всяка проба ДНК, което позволява обединяването на множество проби в едно изпълняване на секвениране. Индексирането на проби е тествано в работни процеси за герминативна линия и за соматични варианти.

Общо 96 индекса на проби бяха тествани с представителен анализ, предназначен да сравни различни гени, обхващащи 12 588 бази на верига във всичките 23 човешки хромозоми, за да се провери способността на анализа да направи последователно генотипиращо обозначаване за дадена проба сред различни комбинации на индексиращи праймери. Y хромозомата не съдържа доверителни региони и не е оценена. Бяха тествани осем уникални проби с 12 различни комбинации за индексиращи праймери на проба. Резултатите за пробите от модула за анализ на герминативна линия бяха сравнени с Platinum Genomes версия 2016-01. Положителното процентно съответствие (PPA) (еднонуклеотидни варианти и индели) надвиши 97% (действително положителните обозначавания бяха най-малко 70 за еднонуклеотидните варианти, 38 за инсерциите, 36 за делециите) и отрицателното процентно съответствие (NPA) беше 100% (най-малко 23 440 референтни позиции на индексна комбинация) за всяка от 96-те индексни комбинации. Независимо беше тестван единичен индекс, за да се потвърди, че секвенциалната химия на MiSeqDx Reagent Kit v3 може да поддържа по-малко от осем проби

(предшестващата химия в универсалния комплект MiSeqDx 1.0 беше ограничена до минимум осем проби). Единичният индекс има стойности на PPA от 98,9% (180/182) за еднонуклеотидни варианти, 100% (38/38) за инсерции и 100% (46/46) за делеции. NPA беше 100% (23 856/23 856).

Дванадесет репликата (24 библиотеки) на проба бяха тествани за измерване на точността на индекса със соматични варианти при честоти от 0,05 – 0,10 с помощта на модула за соматичен вариант (използвани са две индексни комбинации за репликат, за да се извършват соматични обозначавания). PPA беше 100% за еднонуклеотидни варианти (64/64), инсерции (11/11) и делеции (19/19). NPA беше 100% (поне 11 590 референтни позиции за индексна комбинация) за всички индексни комбинации.

Пренасяне на проба

Работният процес на инструмента MiSeqDx включва приготвяне на библиотеки и секвениране на множество проби плюс контроли, обработени наведнъж. Проучването за пренасяне на проби беше проведено, за да се оцени дали фалшиво положителни резултати поради пренасяне на замърсяване от кладенче към кладенче по време на приготвянето на библиотеката с проби, както и замърсяване от изпълняване към изпълняване между последователни секвенции, повлияват резултатите от изпитването. Бяха използвани соматични варианти, като те могат да бъдат открити при събития с по-ниска алелна честота отколкото вариантите с герминативна линия.

Пробите се състояха от четири геномни ДНК проби от клетъчни линии, всяка съдържаща различни панелни мутации в представителен анализ с два гена. Пробите бяха такива, че мутация в позиция в едната ще има референтна (див тип) секвенция в останалите.

Пренасянето от кладенче към кладенче се определя като неуспешен режим, потенциално създаден при стъпките на ръчна обработка (пипетиране, смесване на проби и др.). За да се оцени пренасянето от кладенчето на една проба в друга, бяха изпълнени две изпитателни изпълнявания:

- Шахматна подредба на висококоличествена входна геномна ДНК (gDNA) проба, съдържащата мутация в ген 1, редуваща се с проба с нискоколичествена входна gDNA, съдържаща мутант в ген 2.
- Шахматна подредба на висококоличествена входна gDNA проба, съдържащата мутация в ген 2, редуваща се с проба с нискоколичествена входна gDNA, съдържаща мутация в ген 1.

Във всяко изпълняване бяха оценени общо 12 репликата за фалшиво положителни (напр. мутация в ген 1, докладвана в кладенче, назначено като мутантна проба в ген 2 или обратно).

Пренасянето от изпълняване към изпълняване се определя като неуспешен режим, който може да е създаден от остатъци от предишно изпълняване на секвениране. За да се определи дали има пренасяне между изпълняванията на секвениране, две плаки, всяка от които съдържа 11 репликата на единична уникална проба с висококоличествена входна gDNA плюс празна проба, бяха подготвени и последователно секвенирани на един инструмент MiSeqDx и оценени за фалшиво положителни. Първото изпълняване съдържаеше 11 репликата на мутантната проба на ген 2 плюс една празна. Второто изпълняване съдържаеше 11 репликата на мутантната проба на ген 1 плюс 1 празна. Библиотеката с мутантни проби на ген 2 първо беше секвенирана, последвано от последващо

изпълняване на секвениране с библиотеката на мутантни проби на ген 1, последвано от друго повторно изпълняване на секвениране на библиотеката с мутантни проби на ген 2. Ако се наблюдават мутации в ген 2 в единственото изпълняване на мутант в ген 1 или обратното, това показва пренасяне.

Отчетени са нула фалшиво положителни резултата (0/24, 0%) поради *пренасяне от кладенче към кладенче*. Всички очаквани мутации бяха открити. Отчетени са нула фалшиво положителни резултата (0/24, 0%) поради *пренасяне на изпълняване към изпълняване*. Всички очаквани мутации бяха открити. Отчетени са нула фалшиво положителни резултата (0/48, 0%) поради *общо пренасяне* (комбинирани пренасяния от кладенче към кладенче и от изпълняване към изпълняване).

Характеристики на производителността на герминативна линия

Изследванията, описани тук, използват модула за вариант на герминативна линия за анализиране на данни за секвениране, с изключение на тези проучвания, при които се използва панел с един ген, където беше използван специфичен за анализа модул.

Точност

Следващото проучване беше проведено за оценка на точността на инструмента MiSeqDx с MiSeqDx Reagent Kit v3 и висококачествена ДНК. Това проучване използва дизайн на представителен анализ за изследване на разнообразие от гени, покриващи 12 588 бази в 23 различни хромозоми чрез 150 ампликона. Y хромозомата не съдържа доверителни региони и не е оценена. 12 уникални проби, използвани в това проучване, са от едно семейство – двама родители и 10 деца – често секвенирани от множество лаборатории и методологии за секвениране. Има пет проби от жени и седем от мъже. Всяка от пробите беше тествана в дупликация. Точността беше определена за SNV, инсерции и делеции чрез сравняване на данните от изследването с добре характеризирана референтна база данни. Секвенцията на референтната база данни (Platinum Genomes версия 2016-01) е получена от комбинацията от множество методологии за секвениране, публично достъпни данни и наследствена информация. Въз основа на този референтен метод бяха дефинирани доверителни геномни региони, освен ако не е посочено друго. Пробите бяха изпълнени общо осем пъти; таблиците, представени за демонстриране на точността, се основават на данни от първото изпълняване.

Таблица 1 съдържа данните от изследването, представени с положително и отрицателно процентно съответствие на база за проба, където резултатите от вариантите се сравняват с добре характеризирания съставен референтен метод за изчисления на PPA. Трите типа варианти (SNV, инсерции и делеции) са комбинирани. Тъй като референтният метод предоставя резултати само за еднонуклеотидни варианти и инсерции/делеции, невариантните резултати за бази се сравняват с модела на човешка геномна референтна секвенция hg19 за изчисления на NPA.

Таблица 1 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази на проба с инструмента MiSeqDx

Проба	Средна честота на обозначаване	Общ брой варианти	Общ брой на действително положителни варианти	Общ брой на фалшиво отрицателни варианти	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100

Проба	Средна честота на обозначаване	Общ брой варианти	Общ брой на действително положителни варианти	Общ брой на фалшиво отрицателни варианти	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	PPA	NPA	OPA
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Представителният анализ се състоеше от 150 ампликона, предназначени да покрият разнообразие от геномно съдържание. Съдържанието на гуанин-цитозин (GC) на ампликоните варираше от 26 – 87%. Ампликоните също имат обхват от еднуклеотидни (напр. ПолиА, ПолиТ), динуклеотидни и тринуклеотидни повторения. Данните бяха съставени на база ампликон ([Таблица 2](#)) за определяне на ефекта от геномно съдържание на % правилни обозначавания. % правилни обозначавания се състои от варианти и референтни обозначавания и е по-малък от 100%, ако има както неправилни, така и състояния без обозначавания. Състояния без обозначавания настъпват, когато един или повече филтри не са изпълнени за обозначаването на вариант (напр. недостатъчно покриване).

От осемте фалшиво отрицателни (ФО) варианта от [Таблица 2](#) седем са с инсерция 1 bp на ампликон 111, който също съдържа хомополимер PolyA и съдържание на гуанин-цитозин от 0,29. Останалият 1 фалшиво отрицателен вариант (неправилно обозначаване) беше поради очакван хетерозиготен еднуклеотиден вариант (SNV) на ампликон 125 със съдържание на гуанин-цитозин от 0,68, обозначено като хомозиготен вариант. Честотата на SNV беше 0,71, което е над прага от 0,70 за класифициране като хомозиготен вариант. Ампликонът с най-нисък % на правилни обозначавания (98,2%) беше ампликон 17 с 40 състояния без обозначавания и съдържащ повторения на аденин-тимин (AT) и съдържание на гуанин-цитозин (GC) от 27%.

Таблица 2 Точност на ниво ампликон за инструмента MiSeqDx

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	2232	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
2	1	109465122	109465200	79	79	ПолиА (5), ПолиЦ (5), индел	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	ПолиГ (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	ПолиТ (10), индел	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	ПолиА (5), СТ(3), ТАА(3), индел	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Не е приложимо	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	ПолиА (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	ПолиТ (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	ПолиТ (5), индел	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	ПолиТ (5), ПолиА (6), индел	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Не е приложимо	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	ПолиТ (5), индел	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Не е приложимо	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	ПолиА (5), ПолиТ (5), ПолиА (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	ПолиА (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	ПолиГ (6), ПолиТ (5), ПолиА (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Не е приложимо	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	ПолиА (5), индел	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	ПолиА (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	ПолиА (7), индел	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Не е приложимо	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016 г.	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
30	5	41069808	41069871	64	64	Не е приложимо	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	ПолиА (6), индел	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	ПолиТ (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), АG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	ПолиГ (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	ПолиТ (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Полиц (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	ПолиГ (5), индел	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	ПолиА (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Не е приложимо	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	ПолиА (7), АG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	ПолиГ (5), индел	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	ПолиГ (6), Полиц (6), индел	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Не е приложимо	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Не е приложимо	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	ПолиГ (7), CTC(4), индел	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	ПолиГ (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Не е приложимо	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Полиц (6), индел	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	ПолиГ (5), индел	0,47	1872	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	ПолиТ (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	ПолиА (5), ПолиТ (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), индел	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Не е приложимо	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Не е приложимо	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Не е приложимо	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Не е приложимо	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Не е приложимо	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	ПолиА (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Не е приложимо	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	ПолиГ (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	ПолиА (5), СА(3), индел	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	ПолиЦ (5), индел	0,52	2016 г.	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	ПолиА (7), АС(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Не е приложимо	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	ПолиА (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	ПолиГ (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Не е приложимо	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	ПолиА (5), ПолиТ (7), ПолиА (7), индел	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Не е приложимо	0,25	1992	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
89	14	46958962	46959034	73	72	ПолиТ (5), индел	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	ПолиА (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	ПолиЦ (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	ПолиГ (5), индел	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	ПолиТ (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Не е приложимо	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Не е приложимо	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	ПолиЦ (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	ПолиЦ (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Ролу Т (5), индел	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	ГС(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	ПолиЦ (5), индел	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	ПолиТ (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	ПолиА (13), индел (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	ПолиА (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	ПолиА (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	ПолиТ (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016 г.	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Не е приложимо	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	ПолиА (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
120	18	38836999	38837073	75	75	ПолиА (5), индел	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Не е приложимо	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Не е приложимо	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Не е приложимо	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Не е приложимо	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Не е приложимо	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	ГТ(3), ТГ(4), индел	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	ПолиГ (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	ПолиТ (6), СА(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	ГТ(3), индел	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	ПолиА (6), АГ(3), индел	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	ПолиТ (5), ПолиА (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Не е приложимо	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Не е приложимо	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	ПолиТ (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	ПолиЦ (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Не е приложимо	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	Не е приложимо

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
149	Y	2655519	2655609	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	Не е приложимо
150	Y	2655609	2655679	71	0	ПолиА (5)	0,37	0	0	0	Не е приложимо

Вариантите, които са без обозначавания, са обобщени в [Таблица 3](#). Определените филтри, които доведоха до състояния без обозначавания, са посочени в таблицата. Инсерцията на ампликон 111 беше филтрирана за девет от 16 появи, като останалите седем появи са обозначени като референтни и поради това са фалшиво отрицателни.

Таблица 3 Обобщение на вариантите без обозначавания

Ампликон №	Хром:Позиц	Вариант	Съответстващо съдържание на ампликон	Филтър	Пропуснати варианти	Очаквани варианти	Фалшиво отрицателни обозначавания
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	ПолиА (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Повторете филтъра. Филтрира се вариант, ако целият или част от варианта е наличен неколккратно в референтния геном, прилежащ на позицията на варианта. Изискват се поне девет повторения в препратката и се вземат предвид само повторения с дължина до 5 bp.

Резултатите от секвенирането за проба NA12878 бяха сравнени с високо доверителния генотип за NA12878, установен от Националните институти за стандарти и технологии (NIST) (v.2.19). От 150 ампликона 92 ампликона се съдържаха изцяло във високо доверителните геномни региони, 41 ампликона имаха частично припокриване и 17 ампликона нямаша припокриване в секвенцията на NIST. Това доведе до 10 000 координати на репликат за сравнение. Невариантни обозначавания на бази бяха сравнени с модел на човешка геномна референтна секвенция 19. Резултатите за точността са показани в [Таблица 4](#).

Таблица 4 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази с инструмента MiSeqDx за проба NA12878 с база данни на NIST

Проба	Брой ампликони	Средна честота на обозначаване	Общ брой на действително положителни варианти	Общ брой на фалшиво отрицателни варианти	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	Общ брой на фалшиво положителни обозначавания	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Пробите бяха допълнително анализирани за обозначаване на малки инсерции и делеции (индели) ([Таблица 5](#)). В някои случаи инделът беше често срещан сред две или повече проби, както е отразено в колоната „Общ брой на репликати на проба с индел“. Резултатите за двата репликата от 12 валидни проби са включени в [Таблица 5](#). Има общо 71 индела, вариращи по размер от 1 – 24 bp за инсерции и 1 – 25 bp за делеции. 69 индела бяха открити с положително процентно съответствие от 100%.

Една делеция (ампликон 64; 2 bp делеция (chr10 55892600 TAC>T) не е имала правилни обозначавания, защото всеки от тези варианти е бил без обозначаване поради филтъра R5x9. Поради това, PPA, което не изключва обозначавания, не може да бъде изчислено. Друг индел, 1 bp инсерция (chr17 39589692 C>CA на ампликон 111), също не е имал правилни обозначавания, тъй като девет варианта са били без обозначаване поради филтъра R5x9 и седем са били FN обозначавания.

Таблица 5 Обобщение на откриване на индели с инструмента MiSeqDx

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
1	1	36450544	93	25 bp делеция	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp делеция	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp инсерция	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp делеция	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp инсерция	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp инсерция	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp инсерция	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp делеция	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp инсерция	T>TTAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp инсерция	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp инсерция	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp делеция	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp инсерция	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp делеция	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp делеция	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp инсерция	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp делеция	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp инсерция	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp делеция	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp делеция	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp делеция	CTTTCACITTCCTCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp делеция	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp инсерция	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp делеция	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp инсерция	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp делеция	GGATA>G	8	0	0	8	100

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
50	7	156476548	93	11 bp делеция	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp делеция	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp инсерция	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp инсерция	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp делеция	TCTGGGGGGCAGCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp делеция	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp делеция	AGCGTCTATAACCAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp делеция	TAC>T	10	10	0	0	Не е приложимо
68	11	30177690	70	2 bp инсерция	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp инсерция	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp делеция	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp делеция	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp инсерция	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp инсерция	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp инсерция	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp делеция	ATCTATTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp делеция	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp инсерция	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp делеция	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp делеция	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp делеция	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp делеция	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp инсерция	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp инсерция	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp делеция	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp делеция	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp инсерция	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp инсерция	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp инсерция	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp инсерция	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp делеция	CAGTG>C	12	0	0	12	100

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
114	17	61502459	79	12 bp делеция	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp инсерция	T>TGATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp инсерция	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp делеция	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp делеция	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp инсерция	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp инсерция	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp делеция	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp инсерция	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp делеция	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp делеция	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp инсерция	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp инсерция	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp делеция	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Възпроизводимост

Бяха проведени две проучвания за оценка на възпроизводимостта на инструмента MiSeqDx с клетъчни линии (проучване 1 и 2) или изчерпана от левкоцити кръв с добавени клетъчни линии (проучване 2). Проучване 1 е използвало множество инструменти. Проучване 2 е имало множество центрове.

Проучване 1

Възпроизводимостта на инструмента MiSeqDx беше определена с помощта на два инструмента, двама оператори и две партии с реагенти за общо осем изпълнявания. Представителният анализ, пробите и референтният метод са същите, както са описани за проучването на точността.

Резултатите са представени на база ампликон за всеки инструмент ([Таблица 6](#)), за да се демонстрира възпроизводимостта на обозначаване сред инструментите. % правилни обозначавания включваха както неправилни, така и състояния без обозначавания (един или повече филтъра не са изпълнени за обозначаване на вариант). Инструментите генерираха сходен брой на състояния без обозначавания и неправилни обозначавания в зависимост от конкретния ампликон.

Таблица 6 Проучване за резултати от възпроизводимост на инструмент за инструмента MiSeqDx (на ниво ампликон)

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	ПолиА (5), ПолиЦ (5), индел	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	ПолиГ (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	ПолиТ (10), индел	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	ПолиА (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Не е приложимо	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	ПолиА (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	ПолиТ (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	ПолиТ (5), индел	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	ПолиТ (5), ПолиА (6), индел	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Не е приложимо	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	ПолиТ (5), индел	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Не е приложимо	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	6720	0	0	6720	0	0

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	ПолиА (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), ПолиА (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Не е приложимо	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	ПолиА (5), индел	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	ПолиА (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	ПолиА (7), индел	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Не е приложимо	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Не е приложимо	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	ПолиА (6), индел	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	ПолиТ (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	ПолиГ (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	ПолиТ (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	ПолиЦ (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
41	6	41647401	41647495	95	94	ПолиГ (5), индел	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	ПолиА (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Не е приложимо	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	ПолиА (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	ПолиГ (5), индел	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	ПолиГ (6), ПолиЦ (6), индел	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Не е приложимо	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Не е приложимо	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	ПолиГ (7), СТС(4), индел	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	ПолиГ (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Не е приложимо	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	ПолиЦ (6), индел	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	ПолиГ (5), индел	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	ПолиТ (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	ПолиА (5), ПолиТ (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), индел	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Не е приложимо	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Не е приложимо	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Не е приложимо	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Не е приложимо	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Не е приложимо	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	ПолиА (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Не е приложимо	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	ПолиГ (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	ПолиА (5), СА(3), индел	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	ПолиЦ (5), индел	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	ПолиА (7), АС(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Не е приложимо	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	ПолиА (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	ПолиГ (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Не е приложимо	0,52	7008	0	0	7008	0	0

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
84	13	25816961	25817049	89	88	ПолиА (5), ПолиТ (7), ПолиА (7), индел	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Не е приложимо	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	ПолиТ (5), индел	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	ПолиА (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	ПолиЦ (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	ПолиГ (5), индел	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	ПолиТ (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Не е приложимо	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Не е приложимо	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	ПолиЦ (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	ПолиЦ (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	ПолиТ (5), индел	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	ГС(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	ПолиЦ (5), индел	0,67	8347	0	5	8347	0	5

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	ПолиТ (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	ПолиА (13), индел (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	ПолиА (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	ПолиА (7), АТ(3), АТ(4), индел	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	ПолиТ (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Не е приложимо	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	ПолиА (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	ПолиА (5), индел	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Не е приложимо	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Не е приложимо	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Не е приложимо	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Не е приложимо	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Не е приложимо	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	ПолиГ (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	ПолиТ (6), СА(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	ПолиА (6), AG(3), индел	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	ПолиТ (5), ПолиА (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Не е приложимо	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Не е приложимо	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	ПолиТ (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	ПолиЦ (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Не е приложимо	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	ПолиА (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Резултатите от проучването на възпроизводимостта бяха анализирани на база на всеки оператор, като се използва вариантна честота (Таблица 7). Този анализ демонстрира, че вариантните честоти са еднакви за всички оператори. Представени са средни вариантни честоти +/-1 стандартно отклонение.

Таблица 7 Резултати на оператор спрямо оператор за инструмента MiSeqDx

Диапазон на вариантна честота	Брой уникални варианти	Общ брой на вариантите, анализирани от оператор 1	Общ брой на вариантите, анализирани от оператор 2	Средна (стандартно отклонение) докладвана вариантна честота от оператор 1	Средна (стандартно отклонение) докладвана вариантна честота от оператор 2
Хомозиготен (0,70 – 1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/-0,07	0,96 +/-0,05
Хетерозиготен (0,20 – 0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/-0,04	0,49 +/-0,04

Резултатите от проучването на възпроизводимостта за всяка проба се показват съчетани за всички осем изпълнявания (Таблица 8). Откриването се оценява за всеки тип вариант – еднонуклеотидни варианти, инсерции и делеции – поотделно. Референтните позиции са изключени. Този анализ демонстрира, че резултатите за вариантите бяха възпроизводими сред пробите.

Таблица 8 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази на проба с инструмента MiSeqDx

Проба	Общ брой	SNV					Инсерции			Делеции		
		Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни	Общ брой	Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни	Общ брой	Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Данните, предоставени от осемте изпълнявания в това проучване на възпроизводимостта, подкрепят твърдението, че инструментът MiSeqDx може да секвенира последователно:

- Съдържание на гуанин-цитозин $\geq 19\%$ (всички обозначени бази в 192 от 192-те секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 19%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 1,1%)

- Съдържание на гуанин-цитозин $\leq 78\%$ (всички обозначени бази в 192 от 192-те секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 78%, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)
- Дължини ПолиА ≤ 8 (повторение ПолиА на 8 нуклеотида беше обозначено правилно в 192 от 192-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиА = 8)
- Дължини ПолиТ ≤ 10 (Повторение ПолиТ на 10 нуклеотида беше обозначено правилно в 192 от 192-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиА = 10)
- Дължини ПолиГ ≤ 7 (Повторение ПолиГ на 7 нуклеотида беше обозначено правилно в 192 от 192-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиГ = 7)
- Дължини ПолиЦ ≤ 6 (Повторение ПолиА на 6 нуклеотида беше обозначено правилно в 576 от 576-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиЦ = 6)
- Дължини на динуклеотидно повторение $\leq 11x$ (всички обозначени бази в 192 от 192-те секвенирани ампликона с динуклеотидно повторение 11x бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,5%)
- Дължини на тринуклеотидно повторение $\leq 5x$ (всички обозначени бази в 192 от 192-те секвенирани ампликона с тринуклеотидно повторение 5x бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,5%)
- Инсерции с 24 или по-малко бази и делеции с 25 или по-малко бази
 - Инсерции с 24 бази бяха обозначени правилно в 192 от 192 проби
 - Делеции с 25 бази бяха обозначени правилно в 223 проби и бяха обозначени грешно в 1 от 224 проби

Проучване 2

В проучване за възпроизводимост за център спрямо център, проведено с представителен анализ, анализът за 139 варианта на кистозна фиброза Illumina MiSeqDx включва подмножество от клинично значими генетични вариации на гена на трансмембрания регулатор на кистичната фиброза *CFTR*, анализирани със софтуера на инструмента за съобщаване MiSeq, използвайки насочения към платформата MiSeqDx работен процес на ДНК секвениране. Заслепеното проучване използва 3 изпитвателни центъра и 2-ма оператори на всеки център. Два добре характеризирани панела по 46 проби бяха тествани от всеки от операторите на всеки център за общо 810 обозначавания на център. Панелите съдържаха смесица от геномна ДНК от клетъчни линии с известни варианти в гена *CFTR*, както и изчерпана от левкоцити кръв с добавени клетъчни линии с известни варианти в гена *CFTR*. Кръвните проби бяха предоставени за включването на стъпките на екстракция, използвани за

приготвяне на gDNA, която служи като основа за работния процес на анализа. Честотата на преминаване на проба, определена като броят на пробите, преминали измерванията за качествен контрол при първия опит, беше 99,88%. Всички резултати от теста се основават на първоначално тестване.

Таблица 9 Обобщение на резултатите от проучване на възпроизводимостта, изпълнено с представителен MiSeqDx анализ за 139 варианта на кистозна фиброза

Панел	Проба №	Генотип на пробата	Варианти	Общо обозначавания на център	Обозначавания (варианти) с положително съответствие			Обозначавания (див тип) с отрицателно съответствие			Брой грешни обозначавания	Брой състояния без обозначавания	Положително съответствие (%)	Отрицателно съответствие (%)	Общо съответствие (%)
					Център	Център	Център	Център	Център	Център					
					1	2	3	1	2	3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 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 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	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 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C не са налични	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

Панел	Проба №	Генотип на пробата	Варианти	Общо обозначавания на център	Обозначавания (варианти) с положително съответствие			Обозначавания (див тип) с отрицателно съответствие			Брой грешни обозначавания	Брой състояния без обозначавания	Положително съответствие (%)	Отрицателно съответствие (%)	Общо съответствие (%)
					Център	Център	Център	Център	Център	Център					
					1	2	3	1	2	3					
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Не е приложимо	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	Не е приложимо	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	Не е приложимо	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панел	Проба №	Генотип на пробата	Варианти	Общо обозначавания на център	Обозначавания (варианти) с положително съответствие			Обозначавания (див тип) с отрицателно съответствие			Брой грешни обозначавания	Брой състояния без обозначавания	Положително съответствие (%)	Отрицателно съответствие (%)	Общо съответствие (%)
					Център	Център	Център	Център	Център	Център					
					1	2	3	1	2	3					
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Не е приложимо	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	Не е приложимо	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Не е приложимо	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	Не е приложимо	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	Не е приложимо	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Не е приложимо	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

Панел	Проба №	Генотип на пробата	Варианти	Общо обозначавания на център	Обозначавания (варианти) с положително съответствие			Обозначавания (див тип) с отрицателно съответствие			Брой грешни обозначавания	Брой състояния без обозначавания	Положително съответствие (%)	Отрицателно съответствие (%)	Общо съответствие (%)
					Център	Център	Център	Център	Център	Център					
					1	2	3	1	2	3					
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Не е приложимо	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	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 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	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	Не е приложимо	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	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	Не е приложимо	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
Общо				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Местоположението от див тип, съответстващо на варианта N1303K за един репликат, доведе до състояние без обозначаване поради недостатъчно покритие.

² Един репликат от проби 5 и 75 имаше 0% честота на обозначаване. Последващото разследване разкри, че е възможно пробите да не са били добавени към плаката за проби преди приготвянето на библиотеката, тъй като обемите на пробите, останали в епруветките, са били консистентни, без да е отстранен обем.

³ Доказателствата сочат, че проби 9 и 10 вероятно са били сменени от оператора преди приготвянето на библиотеката.

⁴ Местоположението от див тип, съответстващо на варианта M1V за един репликат на всяка от двете проби, доведе до състояние без обозначаване поради недостатъчно покритие.

Характеристики на производителност на соматичен вариант

Изследванията, описани тук, използват модула за соматичен вариант за анализиране на данни за секвениране, с изключение на тези проучвания, при които се използва панел с два гена, където беше използван специфичен за анализа модул.

Точност

Бяха проведени три проучвания за оценка на точността на инструмента MiSeqDx с ДНК, извлечена от FFPE проби.

Проучване 1

Това проучване използва дизайн на представителен анализ за изследване на разнообразие от гени, покриващи 12 588 бази в 23 различни хромозоми чрез 150 ампликона. Y хромозомата не съдържа доверителни региони и не е оценена. Петте уникални проби, използвани в това проучване, са от едно семейство – двама родители и три деца – често секвенирани от множество лаборатории и методологии за секвениране. Има три проби от жени и две от мъже. Всички проби бяха фиксирани във формалин и включени в парафин, преди ДНК да бъде извлечена за проучването. Проба GM12877 беше разреждана на ниво ДНК с проба GM12878 за създаване на GM12877-D, за да се направи набор от варианти с честоти близо до 5% и 10%. Всяка от пробите беше тествана в две дубликации, с изключение на GM12877-D, която беше тествана с пет репликата. Точността беше определена за SNV, инсерции и делеции чрез сравняване на данните от изследването с добре характеризирана референтна база данни. Секвенцията на референтната база данни (Platinum Genomes версия 2016-01) е получена от комбинацията от множество методологии за секвениране, публично достъпни данни и наследствена информация. Въз основа на този референтен метод бяха дефинирани доверителни геномни региони, освен ако не е посочено друго. Пробите бяха изпълнени общо осем пъти. Таблиците, представени за демонстриране на точността, се основават на данни от първото изпълняване.

Таблица 10 съдържа данните от изследването, представени с положително и отрицателно процентно съответствие на база за проба, където резултатите от вариантите се сравняват с добре характеризирания съставен референтен метод за изчисления на PPA. Трите типа варианти (SNV, инсерции и делеции) са комбинирани. Тъй като референтният метод предоставя резултати само за еднуклеотидни варианти и инсерции/делеции, невариантните резултати за бази се сравняват с модела на човешка геномна референтна секвенция hg19 за изчисления на NPA.

Таблица 10 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази с инструмента MiSeqDx с референтни данни за 6 добре характеризирани проби

Проба	Средна честота на обозначаване	Общ брой варианти	Общ брой на действително положителни варианти	Общ брой на фалшиво отрицателни варианти	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹	98,4	675	650	0	57608	100	100	100
GM12877-D ²		155	155	0		100	100	100

¹ Варианти с честота над 20%.

² Варианти с честота под 20%.

150-те ампликона са предназначени да покрият разнообразие от геномно съдържание. Съдържанието на гуанин-цитозин (GC) на ампликоните варираше от 26 – 87%. Ампликоните също имаха обхват от еднуклеотидни (напр. ПолиА, ПолиТ), динуклеотидни и тринуклеотидни повторения. 6 уникални проби бяха използвани в анализа. Данните бяха съставени на база ампликон (**Таблица 11**) за определяне на ефекта от геномно съдържание на % правилни обозначавания. % правилни обозначавания се състои от варианти и референтни обозначавания и е по-малък от 100%, ако има както неправилни, така и състояния без обозначавания. Състояния без обозначавания настъпват, когато един или повече филтри не са изпълнени за обозначаването на вариант (напр. недостатъчно покриване). Нямаше неправилни обозначавания. Броят на състоянията без обозначавания варираше значително в рамките на ампликоните. Съдържанието на гуанин-цитозин и няколко взаимодействия със съдържанието на гуанин-цитозин бяха най-значимите прогнозни показатели за състояние без обозначаване. 2040/2580 (79%) състояния без обозначавания бяха поради несъответствие със спецификациите за покритие. Ампликони със съдържание на гуанин-цитозин над 78% доведоха до най-много случаи на състояния без обозначавания. Представителен ампликон със

съдържание на гуанин-цитозин 78% имаше общо 675 състояния без обозначавания. Представителен ампликон с 87% имаше общо 1365 състояния без обозначавания. Обсегът на действие може да бъде увеличен чрез намаляване на броя на пробите, заредени на поточната клетка, което би позволило откриването на ампликони с по-високо съдържание на гуанин-цитозин.

Таблица 11 Данни за точност на ниво ампликон

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	ПолиА (5), ПолиЦ (5), индел	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	ПолиГ (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	ПолиТ (10), индел	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	ПолиА (5), СТ(3), ТАА(3), индел	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Не е приложимо	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	ПолиА (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	ПолиТ (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	ПолиТ (5), индел	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	ПолиТ (5), ПолиА (6), индел	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Не е приложимо	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	ПолиТ (5), индел	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), индел	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Не е приложимо	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), индел	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	ПолиА (5), ПолиТ (5), ПолиА (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	ПолиА (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	ПолиГ (6), ПолиТ (5), ПолиА (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Не е приложимо	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	ПолиА (5), индел	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	ПолиА (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	ПолиА (7), индел	0,27	920	0	10	98,9

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
28	5	1882081	1882158	78	75	Не е приложимо	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Не е приложимо	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	ПолиА (6), индел	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	ПолиТ (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), АG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Индел	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	ПолиГ (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	ПолиТ (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	ПолиЦ (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	ПолиГ (5), индел	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	ПолиА (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Не е приложимо	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	ПолиА (7), АG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	ПолиГ (5), индел	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	ПолиГ (6), ПолиЦ (6), индел	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Не е приложимо	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Не е приложимо	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	ПолиГ (7), СТС(4), индел	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	ПолиГ (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Не е приложимо	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	ПолиЦ (6), индел	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	ПолиГ (5), индел	0,47	1170	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	ПолиТ (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	ПолиА (5), ПолиТ (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), индел	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Не е приложимо	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Не е приложимо	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Не е приложимо	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Не е приложимо	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Не е приложимо	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	ПолиА (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Не е приложимо	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	ПолиГ (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	ПолиА (5), СА(3), индел	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	ПолиЦ (5), индел	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	ПолиА (7), АС(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Не е приложимо	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	ПолиА (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	ПолиГ (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Не е приложимо	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	ПолиА (5), ПолиТ (7), ПолиА (7), индел	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Не е приложимо	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	ПолиТ (5), индел	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	1215	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	ПолиА (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	ПолиЦ (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	ПолиГ (5), индел	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	ПолиТ (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Не е приложимо	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Не е приложимо	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	ПолиЦ (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	ПолиЦ (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Ролу Т (5), индел	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	ГС(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	ПолиЦ (5), индел	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	ПолиТ (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	ПолиА (13), индел (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	ПолиА (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	ПолиА (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	ПолиТ (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Не е приложимо	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	ПолиА (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	ПолиА (5), индел	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	1215	0	0	100

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	% правилни обозначавания
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Не е приложимо	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Не е приложимо	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Не е приложимо	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Не е приложимо	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Не е приложимо	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Polu G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	ПолиТ (6), СА(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	ПолиА (6), АG(3), индел	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	ПолиТ (5), ПолиА (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Не е приложимо	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Не е приложимо	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	ПолиТ (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Полиц (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Не е приложимо	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	Не е приложимо
149	Y	2655519	2655609	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	Не е приложимо
150	Y	2655609	2655679	71	0	ПолиА (5)	0,37	0	0	0	Не е приложимо

Вариантите, които са без обозначавания, са обобщени в [Таблица 12](#). Определените филтри, които доведоха до състояния без обозначавания, са посочени в таблицата.

Таблица 12 Обобщение на вариантите без обозначавания

Ампликон №	Хром:Позиц	Вариант	Съответстващо съдържание на ампликон	Филтър	Пропуснати варианти	Очаквани варианти
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	ПолиГ (7), СТС(4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	ПолиГС (3), 87% GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	АС(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	ПолиА (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ Нисък DP: Ниско покритие. Филтриран е вариант, ако дълбочината в поне едно от обединяванията в тази определена позиция е под 900.

² R3x6: Повторете филтъра. Филтрира се вариант, ако целият или част от варианта е наличен неколккратно в референтния геном, прилежащ на позицията на варианта. Най-малко шест повторени в препратка се изискват и само повторения с дължина до 3 bp се вземат под внимание.

Резултатите от секвенирането за пробата бяха сравнени с високо доверителния генотип за NA12878, установен от Националните институти за стандарти и технологии (NIST) (v.2.19). От 150 ампликона 92 ампликона се съдържаха изцяло във високо доверителните геномни региони, 41 ампликона имаха частично припокриване и 17 ампликона нямаха припокриване в секвенцията на NIST. Това доведе до 10 000 координати на репликат за сравнение. Невариантни обозначавания на бази бяха сравнени с модел на човешка геномна референтна секвенция hg19. Резултатите за точността са показани в [Таблица 13](#).

Таблица 13 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази с инструмента MiSeqDx с референция от NIST за проба GM12878

Проба	Брой ампликони	Средна честота на обозначаване	Общ брой на действително положителни обозначавания	Общ брой на фалшиво отрицателни обозначавания	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	Общ брой на фалшиво положителни обозначавания	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Пет неразредени проби бяха допълнително анализирани за обозначаване на малки инсерции и делеции (индели) ([Таблица 14](#)). В някои случаи инделът беше често срещан сред две или повече проби, както е отразено в колоната „Общ брой на репликати на проба с индел“. Резултатите за двата репликата от петте проби са включени в [Таблица 14](#). Има общо 71 индела, вариращи по размер от 1 – 24 bp за инсерции и 1 – 25 bp за делеции. 68 индела бяха открити с положително процентно съответствие от 1. Три инсерции и делеции не са имали правилни обозначавания, защото всеки от тези варианти е бил без обозначаване поради филтъра R3x6. Следователно PPA, който изключва състоянията без обозначавания, не може да бъде изчислен. Трите варианта бяха 1 bp делеция (chr8 24811064 AG>A); 2 bp делеция (chr10 55892600 TAC>T) и 1 bp инсерция (chr17 39589692 C>CA).

Таблица 14 Обобщение на откриване на индели с инструмента MiSeqDx

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
1	1	36450544	93	25 bp делеция	GA AAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp делеция	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp инсерция	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp делеция	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp инсерция	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp инсерция	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp инсерция	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp делеция	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp инсерция	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp инсерция	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp инсерция	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp делеция	TAAC T TAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp инсерция	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp делеция	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp делеция	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp инсерция	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp делеция	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp инсерция	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp делеция	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp делеция	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp делеция	CTTTCAC T TCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp делеция	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp инсерция	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp делеция	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp инсерция	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp делеция	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp делеция	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp делеция	AG>A	15	15	0	0	Не е приложимо
53	8	76518677	67	4 bp инсерция	T>TACTG	9	0	0	9	100

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
55	9	105586193	65	4 bp инсерция	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp делеция	TCTGGGGGGCAGCCCCGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp делеция	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp делеция	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp делеция	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp инсерция	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp инсерция	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp делеция	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp делеция	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp инсерция	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp инсерция	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp инсерция	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp делеция	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp делеция	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp инсерция	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp делеция	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp делеция	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp делеция	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp делеция	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp инсерция	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp инсерция	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp делеция	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp делеция	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp инсерция	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp инсерция	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp инсерция	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp инсерция	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp делеция	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp делеция	TTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp инсерция	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp инсерция	T>TGAG	11	0	0	11	100

Ампликон	Хромозома	Позиция	Размер на анализирания фрагмент	Тип и дължина на индела на ампликона	Индел	Общ брой на репликати на проба с индел	Брой състояния без обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания на индели	Общ брой на правилни обозначавания на индели	PPA
122	18	54815706	85	2 bp делеция	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp делеция	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp инсерция	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp инсерция	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp делеция	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp инсерция	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp делеция	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp делеция	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp инсерция	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp инсерция	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp делеция	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Проучване 2

Това проучване използва серия празни FFPE проби на тъкани от колоректален рак и представителен анализ с два гена, който е сравнен с референтен метод, двупосочно секвениране на Сейнджър (Sanger). От общо 1183 участници 441 участници имат валидни резултати от анализа на Сангър и представителния анализ. Когато се прави оценка на ниво участници ([Таблица 15](#)), 230 от 441 участници са положителни по Сейнджър (открита е мутация по Сейнджър). 227 от тях са положителни при представителния анализ. Останалите 211 от 441 участници са отрицателни по Сангър (не е открита мутация по Сангър). 206 от тях са отрицателни при представителния анализ. Това доведе до положително процентно съответствие (PPA) от 98,7% и отрицателно процентно съответствие (NPA) от 97,6% ([Таблица 15](#)).

Таблица 15 Положително и отрицателно процентно съответствие на резултатите на ниво участници

Представителен анализ	Сангър		Общо
	Положително	Отрицателно	
Положително	227 ¹	5	232
Отрицателно	3 ²	206	209
Performance (Функциониране) Обобщение			
Съответствие Статистика	Точкова оценка	Точно 95% CI	

Представителен анализ	Сангър		Общо
	Положително	Отрицателно	
Общо	230	211	441

Performance (Функциониране) Обобщение		
Съответствие Статистика	Точкова оценка	Точно 95% CI
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%,99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%,99,2%]

¹Има 224 точни съпадения за резултати за нива на всякакви мутации в рамките на участника. За двама участници MiSeqDx открива откритата от мутация по Сангър и една допълнителна мутация. За един участник MiSeqDx и Сангър откриват различни мутации.

²Един участник е имал две мутации, открити по Сангър. Двама участници са имали една мутация, открита по Сангър.

Проучване 3

Това проучване оценява ДНК библиотеки, приготвени с материали за изследване, които са FFPE, за множество типове тъкани. Общо 109 проби, които са FFPE, от осем различни тъкани (дебело черво, яйчник, панкреас, надбъбречна жлеза, пикочен мехур, черен дроб, щитовидна жлеза и гърда) с най-малко 11 материала за изследване, които са FFPE, представляващи всеки тип тъкан). Надбъбречната тъкан включва метастази на тумори на хранопровода, белия дроб, дебелото черво. Другата тъкан има първични тумори. Това проучване използва дизайн на представителен анализ на изследване за 26 гена, обхващащи 21 577 бази в 17 различни хромозоми. Общо шест различни гена (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* и *BRAF*) са секвенирани по Сангър за всеки тумор, който има 1 – 3 гена, секвенирани по Сангър, въз основа на очакваното разпространение на соматични мутации за този тумор. Резултатите от секвенирането на Сейнджър идентифицират 39 SNV соматични мутации в 33 от 109 материала за изследване, които са FFPE. MiSeqDx идентифицира 36 SNV соматични мутации в 32 от 109 материала за изследване, които са FFPE, с една фалшиво отрицателна и две вариантни позиции без обозначавания. PPA беше 97,3%. MiSeqDx идентифицира 78 975 референтни бази сред 109 материала за изследване, които са FFPE, с 29 фалшиво положителни резултата в сравнение със секвенирането на Сейнджър и 3416 без обозначавания. NPA беше 99,9%. Делеция на две бази беше съгласувана между двата метода. Таблица 16 обобщава резултатите по тип тъкан.

Таблица 16 Положително и отрицателно процентно съответствие по тип тъкан

Тип тъкан	Брой проби	Общ брой варианти	Общ брой на действително положителни варианти	Общ брой на фалшиво отрицателни варианти	Общ брой на действително отрицателни обозначавания	Общ брой на фалшиво положителни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	PPA	NPA
Надбъбречна жлеза	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Пикочен мехур	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Гърда	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Дебело черво	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Черен дроб	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Яйчник	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Панкреас	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Щитовидна жлеза	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Общо	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

Възпроизводимост

Бяха проведени две проучвания за оценка на възпроизводимостта на инструмента MiSeqDx с ДНК, извлечена от проби, които са FFPE. Проучване 1 е използвало множество инструменти. Проучване 2 е имало множество центрове.

Проучване 1

Възпроизводимостта на инструмента MiSeqDx беше определена с помощта на два инструмента и двама обучени оператори за общо осем изпълнявания. Представителният анализ, геномният контекст на ампликона, пробите и референтният метод са същите, както са описани за проучване на точността 1 по-горе. Резултатите са представени на база ампликон за всеки инструмент (Таблица 17), за да се демонстрира възпроизводимостта на обозначаване сред инструментите. % правилни обозначавания включваха както неправилни, така и състояния без обозначавания (един или повече филтъра не са изпълнени за обозначаване на вариант). Инструментите генерираха сходен брой на състояния без обозначавания в зависимост от конкретния ампликон. За MiSeqDx 1 е наблюдавано единично неправилно обозначаване в рамките на регион на доверителност, както е дефинирано от референтния стандарт Platinum Genomes. Неправилното обозначаване е фалшиво положително обозначаване за вариант на въвеждане в хромозома 10 на ампликон 64 в позиции от 55892599 до 55892687. Ампликонът имаше динуклеотидно повторение от 11.

Таблица 17 Инструмент за проучване за резултати от възпроизводимост на инструмент за инструмента MiSeqDx (на ниво ампликон)

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
1	1	93	93	Индел	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	ПолиА (5), ПолиЦ (5), индел	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Индел	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Индел	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	ПолиГ (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	ПолиТ (10), индел	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	ПолиА (5), СТ(3), ТАА (3), индел	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Индел	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Индел	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Не е приложимо	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	ПолиА (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	ПолиТ (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	ПолиТ (5), индел	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	ПолиТ (5), ПолиА (6), индел	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Не е приложимо	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	ПолиТ (5), индел	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	АТ(3), индел	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Не е приложимо	0,43	4980	0	0	4980	0	0

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
19	3	70	70	СТ(3), индел	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	ПолиА (5), ПолиТ (5), ПолиА (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Индел	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	ПолиА (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	ПолиГ (6), ПолиТ (5), ПолиА (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Не е приложимо	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	ПолиА (5), индел	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	ПолиА (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	ПолиА (7), индел	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Не е приложимо	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Не е приложимо	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	ПолиА (6), индел	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	ПолиТ (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Индел	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	ПолиГ (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Индел	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), индел	0,61	5532	0	108	5532	0	108

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
38	6	98	98	Polu T (5), ТСТ(3), СТТ (3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Индел	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	ПолиЦ (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	ПолиГ (5), индел	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	ПолиА (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Не е приложимо	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Индел	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	ПолиА (7), АС(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Индел	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	ПолиГ (5), индел	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	ПолиГ (6), ПолиЦ (6), индел	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Не е приложимо	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Индел	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Не е приложимо	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	ПолиГ (7), СТС(4), индел	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Индел	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	ПолиГ (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Индел	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Не е приложимо	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	АТ(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	ПолиЦ (6), индел	0,68	5817	0	3	5818	0	2

Апликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на апликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
59	10	79	78	ПолиГ (5), индел	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	ПолиТ (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	ПолиА (5), ПолиТ (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Индел	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	АС(11), индел	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Не е приложимо	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Не е приложимо	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Не е приложимо	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Индел	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Не е приложимо	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Индел	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Не е приложимо	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	ПолиА (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Не е приложимо	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	ПолиГ (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Индел	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), СА(3), индел	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	ПолиЦ (5), индел	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	ПолиА (7), АС(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
80	12	81	81	Не е приложимо	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	ПолиА (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	ПолиГ (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Не е приложимо	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	ПолиА (5), ПолиТ (7), ПолиА (7), индел	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Индел	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Индел	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Не е приложимо	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	ПолиТ (5), индел	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Индел	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Индел	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	ПолиА (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Индел	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	ПолиЦ (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Индел	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	ПолиГ (5), индел	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	ПолиТ (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Индел	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Не е приложимо	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Индел	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Не е приложимо	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	ПолиЦ (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
103	16	87	87	ТА(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	Полиц (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	ПолиТ (5), индел	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	Полиц (5), индел	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Индел	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Индел	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	ПолиТ (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), индел (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	ПолиА (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	ПолиА (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), индел	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Индел	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	ПолиТ (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Не е приложимо	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	ПолиА (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	ПолиА (5), индел	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	СТС(3), индел	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	СТ(3), индел	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Не е приложимо	0,48	3900	0	0	3900	0	0

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
124	19	99	99	He e приложимо	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	He e приложимо	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	He e приложимо	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	He e приложимо	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG (4), индел	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Индел	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Индел	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	ПолиГ (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Индел	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Индел	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	ПолиТ (6), СА(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), индел	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	ПолиА (6), АG(3), индел	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	ПолиТ (5), ПолиА (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Индел	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	He e приложимо	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Индел	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	He e приложимо	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Индел	0,66	5519	0	1	5519	0	1

Ампликон	Хромозома	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
						Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания	Общ брой на правилни обозначавания	Общ брой на неправилни обозначавания	Общ брой на състояния без обозначавания
145	X	69	69	ПолиТ (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	ПолиЦ (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Не е приложимо	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	ПолиА (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Резултатите от проучването на възпроизводимостта бяха анализирани на база на всеки оператор, като се използва вариантна честота (Таблица 18). Този анализ демонстрира, че вариантните честоти са еднакви за всички оператори. Представени са средни вариантни честоти +/-1 стандартно отклонение.

Таблица 18 Резултати на оператор спрямо оператор за инструмента MiSeqDx

Диапазон на вариантна честота	Брой уникални варианти	Общ брой на вариантите, анализирани от оператор 1	Общ брой на вариантите, анализирани от оператор 2	Средна (стандартно отклонение) докладвана вариантна честота от оператор 1	Средна (стандартно отклонение) докладвана вариантна честота от оператор 2
Висока честота (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/-0,05	0,96 +/-0,05
Средна честота (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/-0,04	0,49 +/-0,04
Ниска честота (3 - 7%)	620	618	612	0,05 +/-0,01	0,05 +/-0,01

Резултатите от проучването на възпроизводимостта за всяка проба се показват съчетани за всички осем изпълнявания (Таблица 19). Откриването се оценява отделно за всеки тип вариант – еднонуклеотидни варианти, инсерции и делеции отделно. Референтните позиции са изключени. Този анализ демонстрира, че резултатите за вариантите бяха възпроизводими сред пробите.

Таблица 19 Съответствие на резултатите от обозначаване на бази на проба с инструмента MiSeqDx

Проба	SNV		Инсерции				Делеции					
	Общ брой	Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни	Общ брой	Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни	Общ брой	Общ брой на действително положителни	Общ брой на фалшиво положителни	Общ брой на фалшиво отрицателни
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹Варианти с честота над 20%.

² Вариант с честота под 20%.

Данните, предоставени от 8-те изпълнявания в това проучване на възпроизводимостта, подкрепят твърдението, че инструментът MiSeqDx може да секвенира последователно.

- Съдържание на гуанин-цитозин $\geq 19\%$ (всички обозначени бази в 120 от 120-те секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 19%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 3,4%)
- Съдържание на гуанин-цитозин $\leq 73\%$ (всички обозначени бази в 120 от 120-те секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 73%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,1%)
- Дължини ПолиА ≤ 8 (повторение ПолиА на 8 нуклеотида беше обозначено правилно в 120 от 120-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиА = 8)
- Дължини ПолиТ ≤ 10 (повторение ПолиТ на 10 нуклеотида беше обозначено правилно в 120 от 120-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиА = 10)
- Дължини ПолиГ ≤ 6 (повторение ПолиГ на 6 нуклеотида беше обозначено правилно в 720 от 720-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиГ = 6)
- Дължини ПолиЦ ≤ 6 (повторение ПолиЦ на 6 нуклеотида беше обозначено правилно в 359 от 360-те секвенирани ампликона, съдържащи ПолиЦ = 6, с 1 състояние без обозначаване)

- Дължини на динуклеотидно повторение $\leq 4x$ (всички обозначени бази в 600 от 600-те секвенирани ампликона с динуклеотидно повторение 4x бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,4%)
- Дължини на тринуклеотидно повторение $\leq 5x$ (всички обозначени бази в 120 от 120-те секвенирани ампликона с тринуклеотидно повторение 5x бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 1,9%)
- Инсерции с 24 или по-малко бази и делеции с 25 или по-малко бази
 - Инсерции с 24 бази бяха обозначени правилно в 120 от 120 проби
 - Делеции с 25 бази бяха обозначени правилно в 182 проби и бяха докладвани като състояние без обозначаване в 2 проби от 184 проби

Проучване 2

Беше изпълнено външно проучване за оценка на възпроизводимостта на представителния анализ с два гена, описан в проучване за точността 2, сред три външни центъра за изпитване (двама оператори на център), една партида с реагенти и три непоследователни дни на изпитване. Изпитването беше проведено с шест добре характеризирани панела с проби на геномни ДНК проби от клинични материали за изследване или клетъчни линии, които са FFPE. Всеки панел се състоеше от 10 члена, общо 60 члена за панелите.

60-те члена на панели се състояха от дубликации на четири уникални материала на изследване от див тип (за мутации на панела), 12 уникални материала на изследване с мутация (с единична мутация), приготвени както при високи, така и при ниски нива на мутационна честота, и два уникални материала на изследване с мутация (с една мутация), приготвени само на ниско ниво на мутационна честота. Всеки уникален материал за изследване/проба с ниво на мутационна честота (тествани при дублициране във всяко изпълняване) имаше 36 възможни резултата (2 репликации \times 2-ма оператори \times 3 дни \times 3 центъра), ако всички резултати са били валидни.

Процентното очаквано обозначаване (PEC) за всички положителни и отрицателни варианти беше оценено чрез сравняване на резултата от представителния анализ с очаквания резултат за мутация (очакваната мутация е открита или не е открита) във всяка проба. PEC се изчислява като 100% се умножи по броя на очакваните обозначавания, разделено на броя на опитаните обозначавания. Двустранният доверителен интервал от 95% се изчислява по метода за оценка на Уилсън.

При комбиниране на центровете честотата на преминаване на пробите е $\geq 94,7\%$ за първото изпълняване на пробата или в проби, изпитвани в изпълнявания, които са били валидни при първо преминаване. PEC на нивото на мутацията сред всички проби с мутация е 99,6% (905/909) (95% CI; 98,9, 99,8). Броят на опитаните обозначавания сред всички 56 мутации на панела (независимо дали се е очаквало откриване на мутация или не) за всички валидни проби беше 58 856 (56 \times 1051). От тези 58 856

наблюдения на ниво мутации е имало само шест инцидента, при които наблюдаваните и очакваните резултати са били несъвместими. PEC на ниво мутация във всички положителни и отрицателни варианти от всички членове на панела с мутация и див тип, взети заедно, е 99,99% (58 850/58 856).

Аналитична чувствителност (граница на празна проба (LoB) и граница на откриване (LoD))

Това проучване потвърди граничната стойност на анализа и определената границата на откриване (LoD) за MiSeqDx с представителен панел. Накратко, добре характеризираните клетъчни линии GM12878 и GM12877 на Platinum Genome бяха фиксирани с формалин и вградени в парафин и след това беше извлечена ДНК. GM12878 беше разрежена с GM12877 така, че честотите на варианта на седемдесет варианта (52 еднонуклеотидни варианта, девет инсерции и девет делеции) бяха близо 0,05. Двете ДНК проби бяха тествани от двама оператори, чрез два инструмента и две партии с реагенти за общо 10 изпълнявания на секвениране с MiSeqDx. Това доведе до 40 репликата за всеки вариант в GM12878 и 60 репликата за всеки съответстващ координат от див тип в GM12877 за всяка партида с реагенти. LoB и LoD бяха изчислени чрез класически подход, посочен в CLSI EP17-A2 чрез непараметрична опция. LoB и LoD бяха изчислени за еднонуклеотидни варианти, инсерции и делеции отделно чрез обединяване на вариантите честоти за даден тип вариант. Грешка тип I беше определена като 0,01, а грешка тип II беше определена като 0,05.

За LoB обединените вариантни честоти бяха сортирани от най-ниска към най-висока и беше изчислена 99-тата ранкова позиция за всяка партида реагенти за всеки тип вариант ([Таблица 20](#)). Софтуерът MiSeqDx използва гранична стойност (ефективната LoB) от вариантна честота 0,026 за определяне на качествено откриване на варианти. Изчислените граници на празна проба потвърдиха, че тази гранична стойност води до грешка тип I от не повече от 0,01.

Таблица 20 Граница на празна проба

Тип вариант	Общ брой на вариантни честоти	LoB за партида с реагент 1 (%)	LoB за партида с реагент 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Инсерция	540	0,79	0,60
Делеция	540	0,96	0,84

За LoD беше калкулиран процентът на честота на индивидуални мутации за всяка партида с реагенти за всеки тип вариант, попадащ под граничната стойност от 0,026 ([Таблица 21](#)). Тъй като процентите бяха по-малки, отколкото при грешка тип II от 5% (0,05), медианата на честотите на комбинираните варианти е изчислена като LoD ([Таблица 21](#)). LoD за всеки вариантен тип беше взет, като по-голямата от двете стойности се изчислява за двете партии с реагенти – 5,45% за еднонуклеотидни варианти (SNV), 4,88% за инсерции и 5,44% за делеции.

Таблица 21 Граница на откриване

Партида с реагенти	Тип вариант	Общ брой на вариантни честоти	Брой измервания на вариантна честота (VF) < 2,6%	% измервания на вариантна честота (VF) < 2,6%	Граница на откриване (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Инсерция	360	0	0,00	4,86
	Делеция	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Инсерция	360	0	0,00	4,88
	Делеция	360	0	0,00	5,24

Следните проучвания демонстрират характеристиките на производителност на MiSeqDx с друг представителен анализ, който е насочен към 56 мутации в два клинично значими ракови гена (мутационен панел). Панелът за мутации е създаден, за да открива специфично 56 мутации в два клинично значими ракови гена (ген 1 и ген 2). Анализът едновременно определя наличието или отсъствието на всяка от 56-те мутации във всяка секвенирана проба. Референтният метод за тези проучвания беше двупосочно секвениране на Сангър.

Прецизност на партида спрямо партида

Проучването за прецизност на партида спрямо партида беше проведено, за да оцени производителността на инструмента MiSeqDx сред произведените партиди с комплекти с реагенти (състоящи се от качествена оценка на проба, приготвяне на библиотека и реагенти за секвениране) чрез представителен анализ с два гена с панел от пет комбинирани материала за изследване, които са FFPE, отговарящи на изискванията на качествена оценка на проба. Всеки материал за изследване, който е FFPE, съдържаше две уникални мутации: една на по-ниско (около 8%) ниво на мутационна честота и една на високо (около 14%) ниво на мутационна честота. Дванадесет (12) наблюдения на всяка от петте смеси от материали за изследване бяха събрани в продължение на три непоследователни дни с три партиди от комплекти с реагенти. Общият брой наблюдения за проучването сред всички партиди с реагенти беше 180 наблюдения сред всички смеси от материали за изследване и 360 наблюдения на всички нива на мутационна честота. Сред всички партиди и дни 99,7% (359/360) от наблюденията показаха очаквания резултат за мутации. Едно нискочестотна мутация беше неправилно обозначена като див тип. За всяка от мутациите/нивата на мутационна честота беше извършен анализ на дисперсията на компонент, за да се оцени вариабилността на системата. Общото стандартно отклонение варираше от 0,011 до 0,029. Компонентът на партидата на реагента от общото стандартно отклонение варираше от 0 до 0,015.

Хронология на редакциите

Документ №	Дата	Описание на промяната
Документ № 200006218 v02	Октомври 2023 г.	Актуализирани препратки към Local Run Manager за версия 4. Актуализиран е етикетът, за да се добавят подробности за австралийския спонсор. Коригирани несъответствия, при които листовката в опаковката се различава от доклада за проучването на MiSeqDx.
Документ № 200006218 v01	Май 2022 г.	Добавеният кат. № в листовката за MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro в „Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени“ не се изисква. Добавена информация за тестване на MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro в „Характеристики на производителността“. Премахната бележка за внимание само за САЩ от „Предупреждения и предпазни мерки“.
Документ № 200006218 v00	Ноември 2021 г.	Първоначално издание за поддръжка MOS v4.0 и Local Run Manager v3.0.

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизведени по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв (такива) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТ(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦАТА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТ(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН (И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2023 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните си притежатели. За конкретна информация относно търговските марки вижте www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, САЩ
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



EC REP



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

Спонсор в Австралия

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

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за Вашия комплект на support.illumina.com в раздела *Документация*.