

75	11	118406328	85	8 bp dzēsums	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp dzēsums	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp ievietojums	T>TTCTCAGTAC GGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp ievietojums	C>CAAAATATAA AAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp ievietojums	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp dzēsums	ATCTATTTTCTAA TAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp dzēsums	TTTAAAATTGAA TGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	4 bp ievietojums	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp dzēsums	CTTGCTCTATAAACCGT> C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp dzēsums	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp dzēsums	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp dzēsums	GCCCCTGAGCCAGCC TCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp ievietojums	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp ievietojums	G>GCTAC	9	0	0	9	100

105	16	85706416	91	7 bp dzēsums	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp dzēsums	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp ievietojums	A>ATCCTATT CTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp ievietojums	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp ievietojums	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp ievietojums	T>TTCTGAAGGTCAA GTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp dzēsums	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp dzēsums	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp ievietojums	T>TGTATCTTAGC AAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp ievietojums	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp dzēsums	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 bp dzēsums	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp ievietojums	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp ievietojums	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100

134	20	62690925	87	16 bp dzēsums	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp ievietojums	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp dzēsums	ACTCAAGATAAC TCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp dzēsums	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp ievietojums	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp ievietojums	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp dzēsums	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

2. pētījums

Šajā pētījumā tika izmantoti uzkrāti FFPE kolorektālā vēža audu paraugi un reprezentatīvas 2 gēna analīzes, kas tika salīdzinātas ar atsauces metodi, divvirzienu Sangeru sekvencēšanu (Sangers). No pavisam 1183 subjektiem 441 subjektam bija derīgi Sangeru un reprezentatīvo analīžu rezultāti. Izvērtēti subjekta līmenī (15. tabula), 230 no 441 subjekta bija pozitīvi, izmantojot Sangeru (Sangeru noteikta mutācija); no tiem 227 bija pozitīvi, izmantojot reprezentatīvās analīzes. Atlikušais 211 no 441 subjekta bija negatīvs, izmantojot Sangeru (Sangers nenoteica mutāciju); no tiem 206 bija negatīvi, izmantojot reprezentatīvās analīzes. Tā rezultātā tika panākta pozitīva procentuāla atbilstība (PPA) — 98,7% un negatīva procentuāla atbilstība (NPA) — 97,6% (15. tabula).

15. tabula Subjekta līmeņa rezultātu pozitīva un negatīva procentuālā atbilstība

Reprezentatīvas analīzes	Sangers		Kopā
	Pozitīvs	Negatīvs	
Pozitīvs	227 ¹	5	232
Negatīvs	3 ²	206	209
Kopā	230	211	441

Veiktspējas kopsavilkums

Atbilstības statistika	Brīža novērtēšana	Tieši 95% CI
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%, 99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%, 99,2%]

¹Tika novēroti 224 tiešas atbilstības subjekta iekšienei, visu mutāciju līmeņa rezultāti; 2 subjektiem MiSeqDx atklāja Sangers atklāto mutāciju un 1 papildu mutāciju; 1 subjektam MiSeqDx un Sangers atklāja dažādas mutācijas.

²Vienam subjektam, izmantojot Sangeru, tika atklātas 2 mutācijas; 2 subjektiem tika atklāta viena mutācija, izmantojot Sangeru.

3. pētījums

Šajā pētījumā tika vērtētas DNS bibliotēkas, kas sagatavotas ar FFPE eksemplāriem vairākos audu tipos. Kopā 109 FFPE paraugi no astoņiem dažādiem audiem (resnās zarnas, olnīcu, aizkuņģa dziedzera, virsnieru, urīnpūšļa, aknu, vairogdziedzera un krūšu) ar vismaz 11 FFPE paraugiem, kas pārstāv katru audu tipu. Virsnieru audos bija metastāzes no barības vada, plaušu, resnās zarnas audzējiem; pārējiem audiem bija primārie audzēji. Šajā pētījumā tika izmantota reprezentatīvā analīze, lai meklētu 26 gēnus, kas aptver 21 577 bāzes 17 dažādās hromosomās. Kopā 6 dažādi gēni (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* un *BRAF*) tika Sangersa sekvencēti ar katru audzēju, 1–3 Sangersa sekvencēti gēni, pamatojoties uz paredzamo somatisko mutāciju izplatību šajā audzējā. Sangersa sekvencēšanas rezultāti identificēja 39 SNV somatiskās mutācijas 33 no 109 FFPE paraugiem. Instruments MiSeqDx identificēja 36 SNV somatiskās mutācijas 32 no 109 FFPE paraugiem ar 1 viltus negatīvu un 2 variantu pozīcijas beznoteikšanas gadījumus. PPA bija 97,3 %. MiSeqDx identificēja 78 975 atsaucē bāzes 109 FFPE eksemplāros ar 29 viltus pozitīviem rezultātiem attiecībā uz Sangersa sekvencēšanu un 2437 beznoteikšanas gadījumiem. NPA bija 99,9 %. Divu bāzu dzēsumi bija saskaņoti starp abām metodēm. 16. tabula apkopo rezultātus pa audu veidiem.

16. tabula Adu veida pozitīva un negatīva procentuālā atbilstība

Adu tips	# Paraugi	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais VN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	PPA	NPA
Virsnieres	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99.9
Urīnpūslis	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99.9
Krūtis	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Resnā zarna	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99.9
Aknas	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99.9
Olnīcas	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99.99
Aizkuņģa dziedzeris	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Vairogdziedzeris	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99.9
Kopā	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	>99.9

Reproducējamība

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu MiSeqDx instrumenta reproducējamību, izmantojot DNS, kas iegūta no FFPE paraugiem. 1. pētījumā izmantoti vairāki instrumenti; 2. pētījums notika vairākās vietās.

1. pētījums

MiSeqDx instrumenta reproducējamība tika noteikta, izmantojot divus instrumentus un divus apmācītus operatorus kopumā astoņos piegājienos. Reprezentatīvās analīzes, amplikona genoma konteksts, paraugi un atsauces metode ir tie paši, kas iepriekš aprakstīti par 1. pētījuma precizitāti. Rezultāti parādīti katram instrumentam uz amplikona bāzes (17. tabula), lai demonstrētu noteikšanas reproducējamību instrumentu starpā. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālais daudzums ietvēra gan nepareizas noteikšanas, gan beznoteikšanas gadījumus (variantu noteikšanai nav sasniegti viena vai vairāku filtru izpildes nosacījumi). Instrumenti ģenerēja līdzīgu beznoteikšanas gadījumu skaitu atkarībā no konkrētā amplikona. MiSeqDx 1 tika novērots viens nepareizas noteikšanas gadījums uzticama reģiona ietvaros, kā noteikts Platinum Genomes atsauces standartā. Nepareizās noteikšanas gadījums bija viltus pozitīva insercijas varianta noteikšana 64. amplikonā, meklējot 10. hromosomu pozīcijās no 55892599 līdz 55892687; amplikonam bija 11 dinukleotīdu atkārtojumi.

17. tabula Reproducējamības starp instrumentiem pētījums MiSeqDx instrumentam (amplikona līmenis)

Amplikonss	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecināto reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	M70215			M70217		
						Pareizas noteikšanas gadījumu kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumu kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumu kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumu kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
1	1	93	93	Indels	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indels	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indels	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indels	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indels	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Nav	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11

15	2	93	93	Nav	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indels	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Nav	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indels	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indels	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Nav	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Nav	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	Nav	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indels	0,43	4498	0	6	4500	0	1

35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indels	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indels	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indels	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Nav	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indels	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indels	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Nav	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indels	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Nav	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indels	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0

55	9	65	65	Indels	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Nav	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indels	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indels	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Nav	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Nav	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Nav	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indels	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Nav	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indels	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Nav	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Nav	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indels	0,53	5100	0	0	5100	0	0

76	11	85	85	Poly A (5), CA (3), indels	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81		0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	12	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Nav	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indels	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indels	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	Nav	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indels	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indels	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indels	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indels	0,25	4079	0	1	4078	0	2

96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indels	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Nav	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indels	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Nav	0,27	3780	0	0	3780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indels	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indels	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indels (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	307
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indels	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4

116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Nav	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indels	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indels	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Nav	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Nav	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Nav	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Nav	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Nav	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), indels	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indels	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indels	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indels	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indels	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0

137	21	87	87	GT(3), indels	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indels	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Nav	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indels	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Nav	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indels	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Nav	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Nav	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Nav	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Reproducējamības pētījuma rezultāti tika analizēti par katru operatoru, izmantojot atšķirīgu biežumu (18. tabula). Šīs analīzes parādīja, ka atšķirīgs biežums starp operatoriem bija pastāvīgs. Tiek parādīts vidējais atšķirību biežums +/- 1 standartnovirze.

18. tabula MiSeqDx instrumenta rezultāti starp operatoriem

Atšķirīgs biežuma diapazons	Unikālo variantu skaits	1. operatora analizēto variantu skaits	2. operatora analizēto variantu skaits	1. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums	2. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums
Augsts biežums (~ 100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Vidējs biežums (~ 50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Mazs biežums (3-7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Katra parauga reproducējamības pētījumu rezultāti ir parādīti, apvienojot tos no visiem astoņiem izmēģinājumiem (19. tabula). Atklāšana tiek vērtēta atsevišķi katram variantu tipam – SNV, ievietojumi un dzēsumi atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas. Šī analīze parādīja, ka variantu rezultāti bija reproducējami paraugos.

19. tabula MiSeqDx instrumentu bāzes noteikšanas rezultātu atbilstība paraugā

Paraugs	SNV				Insercijas				Delēcijas			
	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits
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

¹ Variants ar frekvenci, kas lielāka par 20 %.

² Variants ar frekvenci, kas mazāka par 20 %.

Šajā reproducējamības pētījumā sniegto 8 izmēģinājumu dati apstiprina apgalvojumu, ka MiSeqDx instruments var konsekventi sekvenēt:

- GC saturs $\geq 19\%$ (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem ar 19% GC saturu, ar pareizu noteikšanas gadījumu un bez noteikšanas gadījumu biežumu 3,4%)
- GC saturs $\leq 73\%$ (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem ar 73% GC saturu, ar pareizu noteikšanas gadījumu un bez noteikšanas gadījumu biežumu 0,1%)
- PolyA garums ≤ 8 (8 nukleotīdu PolyA atkārtojums tika pareizi noteikts 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyA = 8)
- PolyT garums ≤ 10 (10 nukleotīdu PolyT atkārtojums tika pareizi noteikts 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyT = 10)
- PolyG garums ≤ 6 (6 nukleotīdu PolyG atkārtojums tika pareizi noteikts 720 no 720 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyG = 6)
- PolyC garums ≤ 6 (PolyC atkārtojums no 6 nukleotīdiem tika pareizi noteikts 359 no 360 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyC = 6, un 1 bez noteikšanas)
- Dinukleotīdu atkārtotās garums ir $\leq 4x$ (visas noteiktās bāzes 600 no 600 sekvencētiem amplikoniem ar 4x dinukleotīdu atkārtojumiem tika noteiktas pareizi ar beznoteikšanas biežumu 0,4%)

- Trinukleofīdu atkārtotā garums ir $\leq 5x$ (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem ar 5x trinukleofīdu atkārtotumu) pareizi noteiktas ar 1,9% beznoteikšanas biežumu)
- 24 vai mazāk bāzes ievietojumu un 25 vai mazāk bāzes dzēsumu
 - 24 bāzes ievietojumi tika pareizi noteikti 120 no 120 paraugiem
 - 25 bāzes dzēsumus pareizi noteica 182 paraugos un ziņoja par neesošiem noteikšanas gadījumiem 2 paraugos no 184 paraugiem

2. pētījums

Tika veikts ārējs pētījums, lai novērtētu reprezentatīvā 2 gēna testa reproducējamību, kas aprakstīts 2. precizitātes pētījumā, 3 ārējās testēšanas vietās (2 operatori katrā vietā), 1 reaģentu partijā un 3 secīgās testēšanas dienās. Pārbaude tika veikta ar 6 labi raksturotiem genomu DNS paraugu paneļiem no FFPE klīniskajiem eksemplāriem vai šūnu līnijām. Katrs panelis sastāv no 10 elementiem, 60 elementu visos paneļos kopā.

60 paneļa elementi sastāv no 4 unikālu savvaļas tipa (paredzēti paneļa mutācijām) eksemplāru dublikātiem, 12 unikāliem mutāciju eksemplāriem (ar vienu mutāciju), kas sagatavoti gan augstā, gan zemā mutāciju biežuma līmenī, un 2 unikāli mutāciju eksemplāri (ar vienu mutāciju), kas sagatavoti tikai zemā mutāciju biežuma līmenī. Katram unikālajam eksemplāra / parauga biežuma līmeņa paraugam (testēts divos eksemplāros katrā piegāzienā) bija 36 iespējamie rezultāti (2 replikāti \times 2 operatori \times 3 dienas \times 3 vietas), ja visi rezultāti bija derīgi.

Paredzamā procentuālā noteikšana (Percent Expected Call — PEC) visos pozitīvajos un negatīvajos variantos tika izvērtēta, salīdzinot katra parauga reprezentatīvās analīzes rezultātu ar sagaidāmo mutācijas rezultātu (konstatēta vai nav konstatēta paredzētā mutācija). PEC tiek aprēķināta kā 100% reizināts ar paredzamo noteikšanas reižu skaitu un dalīts ar noteikšanas mēģinājumu skaitu. Divpusējo 95% ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

Kombinējot vietas, paraugu atbilstības koeficients bija $\geq 94,7\%$ pirmajā parauga testēšanas piegāzienā vai, testējot paraugos piegāzienos, kas bija derīgi pirmajā caurlaides reizē. Mutācijas līmenis PEC visos mutāciju paraugos bija 99,6% (905/909) (95% CI: 98,9, 99,8). Noteikšanas mēģinājumu skaits visās 56 paneļa mutācijās (neatkarīgi no tā, vai konstatētā mutācija bija paredzama vai nē) visiem derīgajiem paraugiem bija 58 856 (56 \times 1051). No šiem 58 856 mutāciju līmeņa novērojumiem bija tikai 6 gadījumi, kad novērotie un paredzamie rezultāti bija nesaskanīgi; mutāciju līmeņa PEC visiem pozitīvajiem un negatīvajiem variantiem no visiem mutāciju un savvaļas tipa paneļa elementiem kopā bija 99,99% (58 850/58 856).

Analītiskā jutība (tukšās robežas (LoB)) un noteikšanas robeža (LoD)

Šis pētījums pārbaudīja pārbaudes robežvērtību un ar reprezentatīvu paneli noteica MiSeqDx noteikšanas robežu (LoD). Īsumā – labi raksturotās plašina genoma šūnu līnijas GM12878 un GM12877 tika formalinā fiksētas un iestrādātas parafinā, un pēc tam DNS tika ekstrahēts. Šūnu līnija GM12878 tika atšķaidīta ar GM12877 tā, lai septiņdesmit variantu (52 SNV, deviņu inserciju un deviņu delēciju) variantu frekvences būtu tuvu 0,05. Divus DNS paraugus pārbaudīja divi operatori, izmantojot divus instrumentus un divas reaģentu partijas, kopumā 10 MiSeqDx sekvencēšanas izpildēs. Rezultātā tika iegūti 40 replikāti katram variantam GM12878 un 60 replikāti katrai atbilstošajai savvaļas tipa koordinātai GM12877 katrā reaģentu partijā. LoB un LoD tika aprēķināti, izmantojot klasisko pieeju, kas norādīta CLSI EP17-A2, izmantojot neparametrisko iespēju. LoB un LoD tika aprēķināti SNV, ievietojumiem un dzēsumiem atsevišķi, apvienojot variantu frekvences dotajam varianta tipam. I tipa kļūda tika definēta kā 0,01, bet II tipa kļūda tika definēta kā 0,05.

LoB gadījumā apvienoto variantu frekvences tika sakārtotas no zemākās līdz augstākajai, un tika aprēķināta 99. pozīcija katrai reaģenta partijai katram variantu tipam (20. tabula). MiSeqDx programmatūra izmanto robežvērtību (efektīvo LoB) 0,026 varianta frekvencē, lai noteiktu variantu kvalitatīvu noteikšanu. Aprēķinātās tukšās robežas apliecināja, ka šī robežvērtība rada I tipa kļūdu ne vairāk kā 0,01.

20. tabula Tukšās robeža

Varianta tips	Kopējais variantu frekvenču skaits	LoB 1. reaģenta partija (%)	LoB reaģenta 2. partija (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Ievietojums	540	0,79	0,60
Dzēsums	540	0,96	0,84

Attiecībā uz LoD tika aprēķināts katras reaģenta partijas individuālā mutācijas biežums procentos katram variantu tipam, kas ir zemāks par robežvērtību 0,026 (21. tabula). Tā kā procenti bija mazāki par II tipa kļūdu 5 % (0,05), kombinēto variantu frekvenču vidējo vērtību aprēķināja kā LoD (22. tabula). Katra varianta veida LoD tika pieņemts kā lielākais no abām vērtībām, kas aprēķinātas abām reaģentu partijām – 5,45 % SNV, 4,88 % ievietojumiem un 5,44 % dzēsumiem.

21. tabula Noteikšanas robeža

Reaģentu partija	Varianta tips	Kopējais variantu frekvenču skaits	VF mērījumu skaits < 2,6 %	% no VF mērījumiem < 2,6 %	Noteikšanas robeža (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Ievietojums	360	0	0,00	4,86
	Dzēsums	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Ievietojums	360	0	0,00	4,88
	Dzēsums	360	0	0,00	5,24

Turpmākie pētījumi parāda MiSeqDx veikspējas raksturlielumus, izmantojot citu reprezentatīvu testu, kura mērķis ir 56 mutācijas divos klīniski nozīmīgos vēža gēnos (mutāciju panelis). Mutāciju panelis ir paredzēts, lai īpaši noteiktu 56 mutācijas divos klīniski nozīmīgos vēža gēnos (1. gēns un 2. gēns). Pārbaude vienlaikus nosaka katras no 56 mutācijām esamību vai neesamību katrā sekvencētajā paraugā. Atsauces metode šiem pētījumiem bija divvirzienu Sangera sekvencēšana.

Precizitāte no partijas līdz partijai

Tika veikts partijas līdz partijai precizitātes pētījums, lai novērtētu MiSeqDx instrumenta veiktspēju ražoto reaģentu komplektu partijās (kas sastāv no paraugu kvalifikācijas, bibliotēkas sagatavošanas un reaģentu secības noteikšanas), izmantojot 2 gēnu reprezentatīvo testu, izmantojot 5 sajauktu FFPE eksemplāru savienošanas paneļa paraugu kvalifikācijas prasības. Katrā FFPE eksemplārā bija 2 unikālas mutācijas: viena ar zemāku (aptuveni 8 %) mutāciju biežuma līmeni, un otra ar augstu (aptuveni 14 %) mutāciju biežuma līmeni. Katram no 5 eksemplāru maisījumiem divpadsmit (12) novērojumi tika savākti 3 dienu laikā pēc kārtas ar 3 reaģentu komplekta partijām. Kopējais pētījuma novērojumu skaits visās reaģentu partijās bija 180 novērojumi visos eksemplāru maisījumos un 360 novērojumi visos mutāciju biežuma līmeņos. Visās partijās un dienās 99,7 % (359/360) novērojumu tika parādīts gaidāmais mutācijas rezultāts. Vienu zemas frekvences mutāciju nepareizi nosauca par savvaļas tipu. Katrai mutācijai / mutācijas biežuma līmenim tika veikta dispersijas komponenta analīze, lai novērtētu sistēmas mainīgumu. Kopējā standartnovirze bija no 0,011 līdz 0,029. Reaģentu partijas sastāvdaļa no kopējās standartnovirzes svārstījās no 0 līdz 0,015.

Patenti un preču zīmes

Šī dokumenta un tā satura īpašumtiesības pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai ligumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto izstrādājumu lietošanu, un nekādiem citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās puses tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī izstrādājuma(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PREČIZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES IZSTRĀDĀJUMU BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMĀTŪRAS), LIETOŠANAS.

© 2021 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

Illumina, MiSeqDx, TruSeq, ķirbju oranžā krāsa un straumēšanas bāzu dizains ir kompānijas Illumina, Inc. un tās saistīto uzņēmumu ASV un/vai citās valstīs reģistrētas preču zīmes. Visi pārējie nosaukumi, logotipi un citas preču zīmes pieder to attiecīgajiem īpašniekiem.

Kontaktinformācija



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, ASV

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nīderlande

Austrālijas sponsors:

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrālija

Produktu marķēšana

Pilnīgu atsauci uz simboliem, kas parādās uz produkta iepakojuma un marķējuma, savam komplektam skatiet simbolu atslēgā vietnes support.illumina.com cilnē *Dokumentācija un literatūra*.