

MiSeqDx[®] instruments

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM

Kataloga Nr. DX-410-1001

Paredzētais lietojums

MiSeqDx instruments ir paredzēts DNS bibliotēku mērķtiecīgai sekvencēšanai, izmantojot cilvēka genoma DNS, kas iegūta no pilna sastāva perifērajām asinīm vai formalinā fiksētiem parafinā ieguldītiem (FFPE) audiem, ja to lieto kopā ar *in vitro* diagnostikas (IVD) analīzēm, ko veic ar instrumentu. MiSeqDx instruments nav paredzēts visa genoma vai *de novo* sekvencēšanai. MiSeqDx instruments ir jāizmanto kopā ar reģistrētiem un uzskaitītiem, akceptētiem vai apstiprinātiem IVD reaģentiem un analītisko programmatūru.

Procedūras principi

Illumina MiSeqDx ir paredzēts cilvēka DNS mērķtiecīgai atkārtotai sekvencēšanai, izmantojot Illumina sekvencēšanas palīgmateriālus un bibliotēkas, kuras sagatavotas no cilvēka genoma DNS, kas iegūta no perifērajām pilnasinīm vai FFPE audiem, izmantojot reģistrētus un uzskaitītus, akceptētus vai apstiprinātus IVD reaģentus. Bibliotēkas tiek sagatavotas, amplificējot mērķus un pievienojot paraugu indeksus un uztvertās sekvenču. Paraugu bibliotēkas tiek uztvertas plūsmas elementā un sekvencētas instrumentā, izmantojot sekvencēšanu ar sintēzes (SBS) ķīmiju. SBS ķīmijā tiek izmantota atgriezeniska terminatora metode, lai noteiktu atsevišķas nukleotīdu bāzes, jo tās ir iekļautas augošās DNS virknēs. Real-Time Analysis (RTA) programmatūra veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze ir pabeigta, sekundārā analīze MiSeqDx instrumentā var apstrādāt bāzu noteikšanas gadījumus. Apstrādē ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, izvietošana, variantu noteikšana un variantu noteikšanas formāta (VCF) failu ģenerēšana ar informāciju par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem. Atkarībā no darbplūsmas MiSeqDx izmanto dažādus sekundārās analīzes moduļus. Ir pieejami moduļi dzimumšūnas līnijas vai somatisko variantu noteikšanas darbplūsmām, kā arī moduļi analīzēm ar specifisku paredzēto lietojumu.

Duālās sāknēšanas konfigurācija

Duālās sāknēšanas konfigurācijā ietilpst aparatūra, programmatūra un instalēšanas procedūras, lai MiSeqDx instruments izpildītu gan *in vitro* diagnostiku (IVD), gan sekvencēšanas analīzes tikai pētniecības vajadzībām (RUO). Duālās sāknēšanas konfigurācija ļauj lietotājam pārslēgties starp instrumenta diagnostikas režīmu un instrumenta pētniecības režīmu. RFID uz sekvencēšanas palīgmateriāliem novērš RUO sekvencēšanas reaģentu izmantošanu, izpildot diagnosticējošo sekvencēšanu.

Procedūras ierobežojumi

- 1 Tikai *in vitro* diagnostikas nolūkiem.
- 2 Marķējumā norādītie rezultāti tika iegūti ar reprezentatīvo analīžu paneļiem, izmantojot pilna sastāva perifērās asinis vai šūnu līnijas dzimumšūnu veikspējas noteikšanai vai FFPE audus vai FFPE šūnu līnijas somatiskās veikspējas noteikšanai, kā arī aprakstītos reaģentus un programmatūras moduļus. Veikspējas raksturlielumi tiek sniegti tikai informatīvos nolūkos. Norādītā validācijas testēšana, kas nepieciešama augstas caurlaidspējas DNS sekvencēšanas analizatoru speciālajām kontrolēm, kalpo tikai instrumenta vispārējo iespēju demonstrēšanai un nenosaka instrumenta iespējas vai piemērotību attiecībā uz jebkādiem īpašiem apgalvojumiem. Visiem diagnostikas testiem, kas izstrādāti lietošanai šajā instrumentā, nepieciešama pilnīga visu veikspējas aspektu validācija.
- 3 Šī izstrādājuma veikspējas raksturlielumu ierobežojumi:
 - sekvencēšanas izvade ≥ 5 Gb;
 - lasījumu caurlaides filtrs ≥ 15 miljoni;

- lasījumu garums (gala pāra izpildē) 2 x 150 bp;
 - bāzēm, kurām rādītājs ir augstāks par Q30, ≥ 80% pie lasījumu garuma 2 x 150 bp.
Bāzēm, kuras ir vienādas ar vai lielākas par 80%, Phred skalas kvalitātes rādītāji ir lielāki par 30, norādot, ka bāzu noteikšanas akurātums ir lielāks par 99,9%.
- 4 MiSeqDx instruments ir validēti tikai tādu cilvēka DNS bibliotēku sekvenčēšanai, kas ekstrahētas no pilna sastāva perifērajām asinīm un FFPE audiem. Bibliotēkas, kas ģenerētas no cita tipa paraugiem, šajā instrumentā nevar izmantot *in vitro* diagnostikas nolūkiem. Šī instrumenta veikspēja mikrobu nukleīnskābju sekvenčēšanā no klīniskajiem paraugiem nav noteikta.
- 5 MiSeqDx instruments ir paredzēti *in vitro* diagnostikas nolūkiem kopā ar reģistrētiem un uzskaitītiem, akceptētiem vai apstiprinātiem IVD reaģentiem vai analīzēm. MiSeqDx instrumentu var izmantot *in vitro* diagnostikas nolūkos kopā ar tālāk minētajām IVD analīzēm vai reģistrētiem reaģentiem.

Nosaukums	Kataloga Nr.	Iepakojuma ieliktna dokumenta nr.
Praxis® Extended RAS Panel (tikai ASV)	20012431	1000000037190
MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījums	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
MiSeqDx cistiskās fibrozes klīniskās sekvenčēšanas analīze	DX-102-1001	15038344
TruSeq Custom Amplicon Kit Dx	20005718	1000000029772
MiSeqDx reaģentu komplekts v3	20012552 / 20037124	1000000030849

Šajā iepakojuma ieliktnī aprakstītie universālie reaģentu ierobežojumi un veikspējas raksturlielumi ir balstīti uz reprezentatīvām analīzēm. IVD testiem paredzēto lietojumu, noteiktos variantus un paraugu tipu skatiet attiecīgā testa iepakojuma ieliktnī.

- 6 Analīžu programmatūra nesaskaņo indeli (insercijas, delēcijas un to kombinācijas) saturu, kura garums pārsniedz 25 bp. Līdz ar to indeli, kuru garums ir lielāks par 25 bp, ar šo analīzes programmatūru nav konstatējami.
- 7 Sistēma ir apstiprināta atsevišķu nukleotīdu variantu (SNV) konstatēšanai un līdz 25 bp delēciju un 24 bp inserciju konstatēšanai, ja to izmanto kopā ar dzimumšūnas līnijas un somatisko variantu moduļu programmatūru. Somatiskās noteikšanas laikā ar variantu biežumu 0,05 tika konstatētas 25 bp delēcijas un 18 bp insercijas.
- 8 Amplikonu lasījumus ar galēju variantu saturu analīzes programmatūra var nesalāgot, tādējādi reģions var tikt ziņots kā savvaļas tips. Šādā galējā saturā ietilpst:
- lasījumi, kas satur vairāk nekā trīs indelus,
 - lasījumi, kuru garums ir vismaz 30 bp, ar SNV saturu, kas lielāks par 4% no kopējā amplikona mērķa garuma (izņemot zondes reģionus), un
 - lasījumi, kuru garums ir mazāks par 30 bp un kuros SNV saturs ir lielāks par 10% no kopējā amplikona garuma (ieskaitot zondes reģionus).
- 9 Lieli varianti, ieskaitot multinukleotīdu variantus (MNV) un lielus indelus, izvades VCF failā var tikt ziņoti kā atsevišķi mazāki varianti.
- 10 Gadījumos, kad ir aptverti divi pārklājušies amplikoni, delēciju varianti var tikt izfiltrēti vai izlaisti, ja delēcijas garums ir lielāks par vai vienāds ar pārklājumu starp pārklātajiem amplikoniem.
- 11 Sistēma nevar konstatēt indelus, ja tie notiek tieši blakus praimerim un ja nav pārklājoša amplikona. Reģioniem, kuros amplikoni pārklājas, analīze nevar konstatēt delēcijas, ja pārklāšanās reģions ir mazāks par konstatējamās delēcijas lielumu. Piemēram, ja pārklāšanās reģions starp diviem blakus esošiem amplikoniem ir divas (2) bāzes, analīze nevar konstatēt delēcijas, kas ietver šīs abas bāzes. Ir iespējams konstatēt vienu bāzes delēciju jebkurā no šīm bāzēm.
- 12 Tāpat kā jebkurai uz hibridizāciju balstītai bibliotēku sagatavošanas darbplūsmā zondējamās alēles un attiecīgi arī sekvenčēšanas laikā veikto noteikšanu var ietekmēt pamatā esoši polimorfismi, mutācijas, insercijas vai delēcijas oligonukleotīdus saistošajos reģionos. Tālāk sniegti piemēri.
- Variants fāzē ar variantu praimera reģionā var netikt amplificēts, tādējādi tiek iegūts kļūdaini negatīvs rezultāts,
 - Varianti praimera reģionā var traucēt atsauces alēles amplifikāciju, tādējādi izraisot nepareizu homozigotiska varianta noteikšanu,

- Indelu varianti praimera reģionā var izraisīt kļūdaini pozitīvu noteikšanu lasījuma beigās blakus praimerim
- 13 Indeli var tikt filtrēti virkņu novirzes dēļ, ja tie rodas tuvu viena lasījuma beigām un ja tiem veikta daļēja salāgošana, nedzēšot nesalāgoto daļu.
- 14 Nelieli MNV nav validēti.
- 15 Kopiju skaita varianti vai strukturālie varianti, piemēram, saplūšana vai translokācija, nav validēti.
- 16 Dzimumšūnas līnijas ierobežojumi:
- MiSeqDx sistēma, izmantojot moduli Germline Variant Module, ir paredzēta, lai nodrošinātu kvalitatīvus dzimumšūnas līnijas variantu (piemēram, homozigotisku, heterozigotiskus, savvaļas tipa) noteikšanas rezultātus.
 - Lietojot kopā ar moduli Germline Variant Module, minimālais segums uz amplikonu, kas ir nepieciešams akurātai variantu noteikšanai, ir 150x. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
 - Kopiju skaita variācijas var ietekmēt to, vai variants tiek identificēts kā homozigotisks vai heterozigotisks.
 - Varianti noteiktā atkārtotā kontekstā tiek izfiltrēti no VCF failiem. Tiek izmantots RMxN atkārtojumu filtrs, lai filtrētu variantus, ja visa varianta vai tā daļas sekvenca atkārtoti parādās atsaucēs genomā blakus varianta pozīcijai. Dzimumšūnas līnijas variantu noteikšanā atsaucē ir nepieciešami vismaz 9 atkārtojumi, lai variants tiktu izfiltrēts, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 5 bp (R5x9).
- 17 Somatiskie ierobežojumi:
- MiSeqDx sistēma, izmantojot moduli Somatic Variant Module, ir izveidota tā, lai sniegtu kvalitatīvus rezultātus somatisko variantu noteikšanai (piemēram, somatisko variantu klātbūtne, kur varianta frekvence ir lielāka par vai vienāda ar 0,026, ja noteikšanas robežvērtība ir 0,05).
 - Lietojot kopā ar moduli Somatic Variant Module, minimālais segums uz amplikonu, kas ir nepieciešams akurātai variantu noteikšanai, ir 450x uz oligonukleotīdu fondu. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
 - Varianti noteiktā atkārtotā kontekstā tiek izfiltrēti no VCF failiem. Tiek izmantots RMxN atkārtojumu filtrs, lai filtrētu variantus, ja visa varianta vai tā daļas sekvenca atkārtoti atrodas atsaucēs genomā blakus varianta pozīcijai. Somatisko variantu noteikšanas gadījumā atsaucē ir jābūt vismaz 6 atkārtojumiem, lai variants tiktu izfiltrēts, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 3 bp (R3x6).
 - Somatisko variantu modulis nevar noteikt atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem. Modulis ir paredzēts, lai konstatētu variantus dažāda variantu biežuma diapazonā, bet variantu biežumu nevar izmantot, lai noteiktu atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem.
 - Normāli audi paraugā ietekmē variantu konstatēšanu. Ziņotā noteikšanas robeža balstās uz variantu biežumu attiecībā pret kopējo DNS, kas ekstrahēta gan no audzēja, gan no normāliem audiem.

Izstrādājuma komponenti

Illumina MiSeqDx sastāv no tālāk norādītajiem komponentiem.

MiSeqDx instruments (kataloga nr. DX-410-1001)

MiSeqDx instrumenta darbībai un datu analīzei nepieciešami tālāk uzskaitītie programmatūras komponenti.

Programmatūras lietojumprogramma	Funkcija	Apraksts
MiSeq operētājsistēma (MOS)	Kontrolē instrumenta darbību	MOS programmatūras lietojumprogramma pārvalda instrumenta darbību sekvencēšanas laikā un ģenerē attēlus, ko izmantot Real-Time Analysis (RTA) programmatūrai. Papildinformāciju skatiet dokumentā <i>MiSeqDx instrumenta atsauces rokasgrāmata programmatūrai MOS v2 (dokumenta nr. 1000000021961)</i> .
Real-time Analysis (RTA) programmatūra	Veic primāro analīzi	RTA programmatūras lietojumprogramma konvertē MOS ģenerētos attēlus katram elementam sekvencēšanas izpildes ciklā par bāzu nosaukšanas failiem, kuri tiek izmantoti kā ievades Local Run Manager analīzes moduļiem. RTA programmatūras lietojumprogrammai nav lietotāja interfeisa.
Local Run Manager	Interfeiss moduļa atlasīšanai	Local Run Manager programmatūra ir instrumentā iebūvēts risinājums lietotāju pārvaldīšanai, sekundārās analīzes izpildīšanai un statusa pārraudzīšanai. Plašāku informāciju skatiet dokumentā <i>Local Run Manager programmatūras atsauces rokasgrāmata instrumentam MiSeqDx (dokumenta nr. 1000000011880)</i> .
Somatic Variant Module	Veic sekundāro analīzi	Šī Local Run Manager analīzes moduļa programmatūra apstrādā bāzu noteikšanas gadījumus ar sekundāro analīzi. Apstrādē ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, izvietošana, variantu noteikšana un ziņošana. Variantu noteicējs (Pisces) ģenerē VCF failus, kuros ir informācija par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem un ir ietverta izmērītā varianta frekvence.
Germline Variant Module	Veic sekundāro analīzi	Šī Local Run Manager analīzes moduļa programmatūra apstrādā bāzu noteikšanas gadījumus ar sekundāro analīzi. Apstrādē ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, izvietošana, variantu noteikšana un ziņošana. Variantu noteicējs (Pisces) ģenerē VCF failus, kuros ir informācija par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem un katrs variants ir identificēts kā heterozigotisks vai homozigotisks.

Uzglabāšana un izmantošana

Elements	Specifikācija
Temperatūra	Transportēšana un uzglabāšana: no -10 °C līdz 40 °C (no 14 °F līdz 104 °F) Lietošanas apstākļi: no 19 °C līdz 25 °C (66 °F līdz 77 °F)
Mitrums	Transportēšana un uzglabāšana: nekondensējošs mitrums Lietošanas apstākļi: 30–75 % relatīvais mitrums (nekondensējošs)

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, kas netiek nodrošināti

Sekvencēšanas palīgmateriāli

MiSeqDx reaģentu komplekts v3 (Kataloga Nr. 20012552 / 20037124)

Lietotāja nodrošināmie palīgmateriāli

Pirms izpildes sākšanas ir jāpārlicinās, ka ir pieejami tālāk norādītie lietotāja nodrošinātie palīgmateriāli.

Palīgmateriāls	Nolūks
Spirta salvetes, 70% izopropanols vai etanols, 70%	Plūsmas šūnas stikla un platformas tīrīšana
Laboratorijas mazplūksnu salvetes	Plūsmas šūnas platformas tīrīšana
Lēcu tīrīšanai paredzēts papīrs, 4 x 6 collas.	Plūsmas šūnas tīrīšana
Tween 20	Instrumenta mazgāšana
Pincete, plastmasas, ar kvadrāta formas galu (neobligāti)	Plūsmas šūnas izņemšana no plūsmas šūnas pārvadāšanas konteinera
Ūdens, laboratorijas kvalitāte	Instrumenta mazgāšana

Vadlīnijas par laboratorijas klases ūdeni

Vienmēr izmantojiet laboratorijas klases ūdeni, lai veiktu procedūras ar instrumentu. Nekādā gadījumā neizmantojiet krāna ūdeni.

Jebkurš no šiem ir pieņemams piemērs:

- Illumina PW1;
- 18 megaomu ($M\Omega$) ūdens
- Milli-Q ūdens;
- Super-Q ūdens
- Molekulārās bioloģijas pakāpes ūdens

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

UZMANĪBU!

Federālie likumi ierobežo šīs ierīces tirdzniecību, ko veic ārsts vai kas tiek veikta ārsta vai cita ar prakses vietas štata likumiem licencēta speciālista uzdevumā, lietošanu vai ierīces lietošanas pieprasīšanu.

- 1 **Daži reaģentu komponenti, ko nodrošina Illumina izmantošanai ar MiSeqDx instrumentu satur potenciāli bīstamas ķīmiskas vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimds un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem.** Informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapā vietnē support.illumina.com/sds.html.
- 2 Rīkojieties ar visiem asins paraugiem tā, it kā būtu zināms, ka tie inficēti ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), cilvēka B hepatīta vīrusu (HBV) un citiem ar asinīm pārnēsājamu patogēnu ierosinātajiem (vispārīgi piesardzības pasākumi).
- 3 Neievērojot aprakstītās procedūras, rezultāti var būt kļūdaini vai var ievērojami pasliktināties parauga kvalitāte.
- 4 Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojoties ar paraugiem un komplekta reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimds un laboratorijas uzsvārcus. Pēc paraugu un komplekta reaģentu izmantošanas ir rūpīgi jānomazgā rokas.
- 5 Ir nepieciešama pienācīga laboratorijas prakse un laba laboratorijas higiēna, lai PĶR produkti nepiesārņotu reaģentus, instrumentus un genoma DNS paraugus. PĶR piesārņojums var izraisīt kļūdainus un neuzticamus rezultātus.
- 6 Lai novērstu piesārņojumu, pārliedcinieties, ka pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās ir nepieciešamais aprīkojums un palīgmateriāli (piemēram, pipetes, pipetes uzgaļi, sildīšanas bloks, maisītāji un centrifūgas).
- 7 Rādītāju un paraugu pāriem ir precīzi jāatbilst drukātajam plates izkārtojuma. Pēc ievadīšanas moduli Local Run Manager automātiski aizpilda ar paraugu nosaukumiem saistītos rādītāju praimerus. Pirms sekvencēšanas izpildes lietotājam ir ieteicams pārbaudīt indeksu praimeru saistību ar paraugiem. Nesakritības starp paraugu un plates izkārtojumu rezultējas pozitīvas parauga identifikācijas zudumā un nepareizā rezultātu ziņošanā.
- 8 Lai aizsargātu datoru pret vīrusiem, ir ļoti ieteicams instalēt lietotāja piegādātu pretvīrusu programmatūru. Instalēšanas instrukcijas skatiet lietotāja rokasgrāmatā.
- 9 Nelietojiet MiSeqDx, ja kāds no paneļiem ir noņemts. Ja instruments tiek darbināts, kamēr kāds no paneļiem ir noņemts, pastāv risks saskarties ar līnijas spriegumu un līdzstrāvas spriegumu.
- 10 Nepieskarieties plūsmas elementa stāvoklim plūsmas elementa nodalījumā. Sildītājs šajā nodalījumā darbojas 22–95 °C diapazonā un var izraisīt apdegumus.
- 11 Instruments sver aptuveni 57 kg (126 mārciņas) un var radīt nopietnus ievainojumus, ja to nepareizi lieto un ja tas nokrīt.

Lietošanas instrukcija

Šajās MiSeqDx instrumenta lietošanas instrukcijās ir nepieciešami reaģenti, kas iekļauti MiSeqDx reaģentu komplektā v3.

Izpildes izveide programmatūrā Local Run Manager

Detalizētas instrukcijas skatiet dokumentā *Local Run Manager programmatūras atsauces rokasgrāmata instrumentam MiSeqDx (dokumenta nr. 100000011880)* un izmantotā analīzes moduļa Local Run Manager moduļa rokasgrāmata.

- 1 Atlasiet **Create Run** (Izveidot izpildi) un atlasiet Local Run Manager moduli Somatic Variant vai Germline Variant.
- 2 Ievadiet izpildes nosaukumu, kas identificē izpildi no sekvencēšanas līdz analīzei.
- 3 Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojumus vai defises.
- 4 [Neobligāti] Ievadiet izpildes aprakstu, lai izpildi būtu vieglāk identificēt. Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojumus vai defises.

Izpildes manifestējamo failu importēšana

- 1 Nodrošiniet, lai manifesti, kurus vēlaties importēt, ir pieejami kādā tīkla atrašanās vietā vai USB atmiņā.
- 2 Atlasiet **Import Manifests** (Importēt manifestācijas).
- 3 Dodieties uz manifestāciju failu un atlasiet manifestācijas, kuras vēlaties pievienot.

Izpildes paraugu norādīšana

Norādiet paraugus izpildei, izmantojot tālāk norādītās opcijas.


Manuāla paraugu ievade — izmantojiet tukšo tabulu ekrānā Create Run (Izveidot izpildi).

Import samples (Importēt paraugus) — pārejiet uz ārēju failu attiecīgajā formātā. Ekrānā Create Run (Izveidot izpildi) lejupielādei ir pieejama veidne.


Pēc paraugu tabulas aizpildīšanas jūs varat eksportēt paraugu informāciju uz ārēju failu un izmantot šo failu kā atsauci, sagatavojot bibliotēkas vai importējot failu citai izpildei.

Manuāla paraugu ievade

- 1 Nolaižamajā sarakstā atlasiet paraugu skaitu un rādītāju kopu.
- 2 Ievadiet unikālu parauga nosaukumu (*Somatic Variant analīzes modulis*) vai parauga ID (*Germline Variant analīzes modulis*).
Izmantojiet burtciparu rakstzīmes, svītras vai pasvītrojumus.
Modulim Somatic Variant parauga nosaukums, kas ievadīts vienā parauga iedobē, automātiski aizpilda atbilstošo iedobi otrā fondā.
- 3 [Neobligāti] Pozitīvas vai negatīvas kontroles paraugiem veiciet klikšķi ar peles labo pogu un atlasiet kontroles veidu.
Modulim Somatic Variant kontroļu kopa vienā parauga iedobē automātiski aizpilda atbilstošo iedobi otrā fondā ar tādu pašu kontroli.
- 4 [Neobligāti] Atlasiet cilni Description (Apraksts) un ievadiet parauga aprakstu. Izmantojiet burtciparu rakstzīmes, svītras vai pasvītrojumus.
Modulim Somatic Variant apraksts, kas ievadīts vienā parauga iedobē, automātiski aizpilda atbilstošo iedobi otrā fondā.
- 5 Atlasiet cilni **Index 1 (i7)** (1. indekss (i7)) un nolaižamajā sarakstā atlasiet adapteri Index 1 (1. indekss).
- 6 Atlasiet cilni **Index 2 (i5)** (2. indekss (i5)) un nolaižamajā sarakstā atlasiet adapteri Index 2 (2. indekss).
- 7 Atlasiet manifesta failu nolaižamajā sarakstā Manifest (Manifests).
Modulī Somatic Variant fondā A esošiem paraugiem ir nepieciešams cits manifests nekā paraugiem fondā B.

- 8 Izvēlieties opciju, lai skatītu, drukātu vai saglabātu plāksnes izkārtojumu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
 - Atlasiet ikonu  **Print** (Drukāt), lai parādītu plāksnes izkārtojumu. Atlasiet opciju **Print** (Drukāt), lai drukātu plāksnes izkārtojumu.
 - Atlasiet opciju **Export** (Eksportēt), lai eksportētu parauga informāciju uz ārējo failu.
- 9 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

Paraugu importēšana

- 1 Noklikšķiniet uz **Import Samples** (Importēt paraugus) un pārlūkojiet uz vietu, kur atrodas parauga informācijas fails. Var importēt divu veidu failus.
 - Ekrānā Create Run (Izveidot izpildi) atlasiet **Template** (Veidne), lai izveidotu jaunu plāksnes izkārtojumu. Veidnes fails satur pareizus kolonnu virsrakstus importēšanai. Katrā kolonnā ievadiet informāciju par izpildes paraugiem. Izdzēsiet neizmantotajās šūnās esošo piemēru informāciju un pēc tam saglabājat failu.
 - Izmantojiet parauga informācijas failu, kas tika eksportēts no analīzes moduļa, izmantojot funkciju Export (Eksportēt).
- 2 Noklikšķiniet uz ikonas  **Print** (Drukāt), lai parādītu plāksnes izkārtojumu.
- 3 Atlasiet **Print** (Drukāt), lai izdrukātu plāksnes izkārtojumu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
- 4 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

Reaģentu kasetnes sagatavošana

Nākamajās instrukcijās ir apraksts, kā atkausēt reaģentus, izmantojot istabas temperatūras ūdens vannu.

- 1 Izņemiet reaģentu kasetni no glabātavas, kuras temperatūra ir no $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Ievietojiet reaģentu kasetni ūdens vannā, kur ir pietiekami daudz dejonizēta ūdens istabas temperatūrā, lai reaģentu kasetnes pamatni iegremdētu līdz ūdens līnijai, kura ir drukāta uz šīs reaģentu kasetnes. Neļaujiet ūdenim pārsniegt maksimālo ūdens līniju.

1. attēls Maksimālā ūdens līnija



- 3 Ļaujiet reaģentu kasetnei kust istabas temperatūras ūdens vannā apmēram 60–90 minūtes, līdz tā ir atkususi pilnībā.
- 4 Izņemiet kasetni no ūdens vannas un viegli piesitiet to pret galdu, lai izvadītu ūdeni no kasetnes pamatnes. Nosusiniet kasetnes pamatni. Nodrošiniet, lai uz reaģentu kasetnes augšpusē neuzšļakstītos ūdens.

Reaģentu kasetnes pārbaudīšana

- 1 Apgrīziet reaģentu kasetni desmit reizes, lai sajauktu atkausētos reaģentus, un pēc tam pārbaudiet, vai visas pozīcijas ir atkusušas.

PIEZĪME

Lai nodrošinātu pareizu sekvencēšanu, ir ļoti svarīgi, lai kasetnē esošie reaģenti būtu pilnīgi atkususi un samaisīti.

- 2 Pārbaudiet reaģentus 1., 2. un 4. pozīcijā, lai pārlicinātos, ka tie ir pilnībā samaisīti un ka tajos nav nogulšņu.
- 3 Lai samazinātu reaģentos esošo gaisa burbuļu skaitu, viegli piesitiet ar kasetni pret galdu.

PIEZĪME

MiSeqDx iesūcējcaurulītes sniedzas līdz katra rezervuāra apakšai, lai iesūktu reaģentus, tādēļ ir svarīgi, lai rezervuāros nebūtu gaisa burbuļu.

- Novietojiet reaģentu kasetni uz ledus vai atlieciet to vietā, kur temperatūra ir no 2 °C līdz 8 °C (līdz 6 stundām), līdz esat gatavs iestatīt izpildi. Lai iegūtu labākos rezultātus, uzreiz ievietojiet paraugu un iestatiet izpildi.

Paraugu sagatavošana sekvencēšanai

Norādījumus par to, kā sagatavot paraugu bibliotēkas sekvencēšanai, tostarp par bibliotēku atšķaidīšanu un apkopošanu, skatiet bibliotēku sagatavošanas komplekta Lietošanas pamācības sadaļas ieliktnī.

Paraugu bibliotēku atšķaidīšana ir atkarīga no oligonukleotīdu kopumu sarežģītības. Nepieciešams optimizēt klasteru blīvumu instrumentā MiSeqDx, un optimālais klastera blīvums mainās atkarībā no konkrētās bibliotēkas sagatavošanas testa.

Paraugu bibliotēku ievietošana kasetnē

Kad reaģentu kasetne ir pilnīgi atkausēta un gatava lietošanai, jūs esat gatavs ievietot paraugus kasetnē.

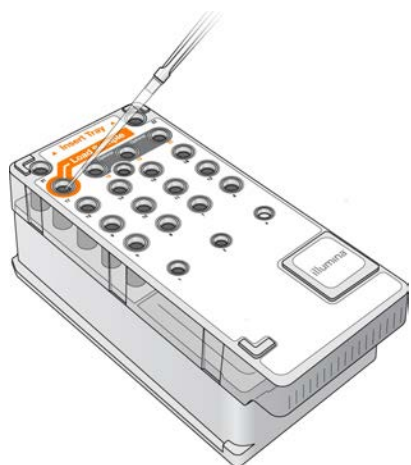
- Izmantojiet atsevišķu, tīru un tukšu 1 ml pipetes galu, lai caurdurtu folijas plombu pār rezervuāru reaģentu kasetnei, kas ir marķēta kā **Load Samples** (Ievietot paraugus).

PIEZĪME

Nedrīkst caurdurt nevienu citu reaģentu pozīciju. Citas reaģentu pozīcijas izpildes laikā tiek caurdurtas automātiski.

- Ar pipeti pārceļiet 600 µl **DAL** paraugu bibliotēkas rezervuārā **Load Samples** (Ievietot paraugus). Centieties nepieskarties folijas plombai.
- Pēc parauga ievietošanas pārbaudiet, vai rezervuārā nav gaisa burbuļu. Ja ir gaisa burbuļi, viegli piesitiet ar kasetni pret galdu, lai šos burbuļus izvadītu.

2. attēls Bibliotēku ievietošana



- Pāreijiet tieši pie izpildes iestatīšanas procedūrām, izmantojot MiSeq operētājsistēmas programmatūras (MOS) interfeisu.

Izpildes iestatīšana

Pilnīgas izpildes iestatīšanas instrukcijas skatiet *MiSeqDx instrumenta atsauces rokasgrāmata programmatūrai v2* (dokuments nr. 100000021961).

- Piesakieties MiSeqDx, izmantojot savu Local Run Manager programmatūras paroli.
- MOS programmatūras ekrānā Home (Sākums) atlasiet **Sequence** (Sekvence).
- Sarakstā atlasiet kādu izpildi un pēc tam atlasiet **Next** (Tālāk). Izpildes iestatīšanas ekrānu sērija tiks atvērta šādā secībā: ievietot plūsmas elementu, ievietot reaģentus, pārskatīšana un pirmsizpildes pārbaude.
- Kad tiek parādīts ekrāns “ievietot plūsmas elementu”, notīriet un pēc tam ievietojiet plūsmas elementu.
- Aizveriet plūsmas elementa aizbīdņi un plūsmas elementa nodalījuma durvis. Pirms izpildes uzsākšanas gan aizbīdņiem, gan nodalījuma durvīm jābūt aizvērtiem. Kad plūsmas elements ir ievietots, programmatūra nolasa un reģistrē RFID. Ekrāna apakšējā labajā stūrī parādās apstiprinājums, ka RFID ir veiksmīgi nolasīts.

- 6 Izpildiet programmatūras norādījumus, lai ievietotu MiSeqDx SBS šķīduma (PR2) pudeli, pārlicinieties, ka atkritumu pudele ir tukša, un ievietojiet reaģentu kasetni.
Kad ievietota MiSeqDx SBS šķīduma (PR2) pudele un reaģentu kasetne, programmatūra nolasa un reģistrē RFID. Ekrāna apakšējā labajā stūrī parādās apstiprinājums, ka RFID ir veiksmīgi nolasīts.
- 7 Kad tie uzsākta izpilde, tiek atvērta sekvencēšanas ekrāns. Šajā ekrānā ir redzama notiekošā izpilde, tostarp intensitātes un kvalitātes novērtējumi (Q-scores).

Rezultāti

Reāllaika analīze (Real-Time Analysis — RTA) ir integrēta programmatūra, kas veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze ir pabeigta, MiSeqDx instrumenta modulis, kas atlasīts *Izpildes izveide programmatūrā Local Run Manager* 6. lpp., sāk sekundāro analīzi, kā aprakstīts šeit.

Demultipleksēšana

Demultipleksēšana salīdzina katra rādītāja nolasījuma sekvenci ar rādītāja sekvencēm, kas norādītas izpildes sērijai. Šajā darbībā netiek ņemtas vērā kvalitātes vērtības.

Rādītāju nolasījumi tiek identificēti, veicot tālāk norādītās darbības.

- Paraugi tiek numurēti, sākot no 1, secībā, kādā tie ir uzskaitīti izpildes sērijas veikšanai.
- Nulles paraugs (0) ir rezervēts klasteriem, kas netika piešķirti paraugam.
- Klasterus piešķir paraugam, ja rādītāja sekvence precīzi atbilst vai ja katram rādītāja nolasījumam pastāv ne vairāk kā viena neatbilstība.

FASTQ faila ģenerēšana

Pēc demultipleksēšanas programmatūra ģenerē starpposma analīzes failus FASTQ formātā, kas ir sekvenču attēlošanā izmantots teksta formāts. FASTQ failos ir katra lasījuma paraugi un ar tiem saistītie kvalitātes rādītāji. Tiek izslēgtas visas kontroles, kas tika izmantotas izpildei, un klasteri, kas neizturēja filtra prasības.

Katrā FASTQ failā ir lasījumi tikai vienam paraugam, un šī parauga nosaukums ir iekļauts FASTQ faila nosaukumā. Somatic Variant darbplūsmā katram paraugam tiek ģenerēti četri FASTQ faili (divi katrā oligonukleotīdu kopā), divi no 1. nolasījuma un divi no 2. nolasījuma. FASTQ faili ir galvenā salīdzināšanas ievade.

Salīdzināšana

Salīdzināšanas gaitā joslotais Smita–Votermana algoritms salīdzina klasterus no katra parauga ar amplikonu sekvencēm, kas norādītas manifestācijas failā.

Joslotais Smita–Votermana algoritms veic semiglobālu sekvenču izvietošanu, lai noteiktu līdzīgus reģionus starp divām sekvencēm. Smita–Votermana algoritms salīdzina nevis kopējo sekvenci, bet visu iespējamo garumu segmentus.

Katru pāra galu nolasījumu novērtē, salīdzinot ar šī nolasījuma attiecīgajām zondes sekvencēm.

- 1. nolasījums tiek vērtēts, salīdzinot ar lejupvērsto lokusam raksturīgo oligonukleotīdu (Downstream Locus-Specific Oligo — DLSO) atgriezenisko komplementu.
- 2. nolasījums tiek vērtēts pret augšupstraumes lokusam raksturīgajiem oligoelementiem (Upstream Locus-Specific Oligo — ULSO).
- Ja nolasīšanas sākums atbilst zondes sekvencei, kurā nav vairāk kā trīs atšķirības (neatbilstības vai nobīdes vadošo ievietojumu/delēciju dēļ), nolasījuma pilnais garums tiek salīdzināts ar amplikona mērķi šai secībai.
- Ievietojumi/delēcijas DLSO un ULSO robežās netiek novērotas, ņemot vērā testa izmantotās ķīmiskās vielas.

Izvietošanas rezultāti tiek rakstīti izvietošanas failos (BAM failos). Nolasījumi tiek izfiltrēti no izvietošanas rezultātiem, ņemot vērā uz neatbilstības koeficientu interesējošajā reģionā vai visā amplikonā (atkarībā no amplikona garuma). Filtrētie nolasījumi tiek ierakstīti salīdzināšanas failos, bet tiek atzīmēti kā nesalīdzināti un netiek izmantoti variantu noteikšanā.

Varianta noteikšana

Variantu noteicējs (Piscis) ir paredzēts, lai veiktu SNV, MNV un indel variantu noteikšanu, izmantojot instrumentam sagatavotajām bibliotēkām.

Atskaites un papildu izvades faili

Variantu analīzes moduļi izveido PDF un ar tabulēšanas rakstzīmi atdalītas (*.txt) atskaites, kur ir parādītas tādas metrikas kā sekvencēšanas dziļums un variantu skaits. Šie moduļi izveido arī izvades failus, piemēram, VCF un genoma variantu noteikšanas formāta (genome Variant Call Format – gVCF) failus.

Kvalitātes kontroles procedūras

MiSeqDx programmatūra novērtē katru izpildi, paraugu un bāzu noteikšanu, salīdzinot to ar kvalitātes kontroles metriku. Jānovērtē arī pozitīvās un negatīvās kontroles, kas ietvertas bibliotēkas sagatavošanā. Novērtējiet kontroļu sekvencēšanas kontroles rezultātus, kā norādīts tālāk.

- Ja veidnē neesoša kontrole ģenerē noteikšanas koeficientu $> 10\%$, iespējams, ir radusies kļūda parauga izsekošanā, notikusi nepareiza indeksēšanas praimeru reģistrēšana vai piesārņojums veidnē neesošajā kontrolē. Tiek uzskatīts, ka protokols ir nesekmīgs, un viss protokols ir jāatkārto, sākot no bibliotēkas sagatavošanas.
- Pozitīvās kontroles paraugam ir jāģenerē gaidītais rezultāts. Ja pozitīvā kontrole ģenerē rezultātu, kas atšķiras no gaidītā, iespējams, ir radusies kļūda parauga izsekošanā vai ir notikusi nepareiza indeksēšanas praimeru reģistrēšana. Viss protokols ir jāatkārto, sākot no bibliotēkas sagatavošanas.

Veiktspējas raksturlielumi

Dzimumšūnas līnijas pētījumos bibliotēkas sagatavošanai izmantoja MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījumu vai TruSeq pielāgoto amplikonu komplekta Dx reaģentus. Divos komplektos tiek izmantoti identiski bibliotēkas sagatavošanas reaģenti, un tiem ir tikai viena darbplūsmas atšķirība: polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) ciklu skaits (attiecīgi 25 un 28). Papildu PCR cikli ļauj zemāku DNS ievadi ar TruSeq pielāgoto amplikonu komplektu Dx (50 ng) attiecībā pret MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījumu (250 ng), kā parādīts DNS ievades pētījumā, izmantojot TruSeq ielāgoto amplikonu komplektu Dx. Bibliotēkas, kas sagatavotas ar MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījumu, tika sekvenētas ar komplektā esošajiem sekvences reaģentiem. Bibliotēkas, kas sagatavotas ar TruSeq pielāgoto amplikonu komplektu Dx, tika sekvenētas ar MiSeqDx reaģentu komplektu v3. Pēdējie sekvencēšanas reaģenti ir palielinājuši izlaidi salīdzinājumā ar MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījumā izmantotajiem.

Somatiskajos pētījumos tika izmantots TruSeq ielāgoto amplikonu komplektu Dx ar MiSeqDx reaģentu komplektu v3.

Visi pētījumi tika veikti ar MiSeqDx. Vai nu dzimumšūnas līnijas, vai somatiskajai darbplūsmai, kas aprakstīta TruSeq pielāgoto amplikonu komplektā Dx, lai sagatavotu bibliotēkas sekvenēšanai, sekoja analīze, izmantojot attiecīgi Germline Variant Module vai Somatic Variant Module, ar diviem izņēmumiem. Pētījumos, izmantojot reprezentatīvas mutācijas paneļus, izmantojot vienu gēnu (dzimumšūnas līnijas veiktspēja; MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījums) vai divus gēnus (somatiskā veiktspēja), izmantoja testēšanai specifiskas darbplūsmas un analīzes moduļus.

Amplikona genomiskais saturs tiek apkopots, salīdzinot ar sekvencēto genoma virkni. Amplikoniem, kas izveidoti pret mīnus virkni, atsaucē genoma saturs ir apgriezts komplements (piemēram, PolyA reģioni uz mīnus virknes amplikoniem atbilst PolyT reģioniem atsaucē genomā).

Veiktspējas raksturlielumiem izmantoto aprēķinu definīcijas

- 1 Pozitīvā procentuālā sakritība (Positive Percent Agreement – PPA) tiek aprēķināta kā proporcija ar analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā variantus.
 - (analīzes pareizi ziņoto variantu lokusu skaits) / (kopējais variantu lokusu skaits)
 Analīzes ziņotie variantu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi pozitīvi (true positive – TP). Variantu lokusi, kurus analīze ziņo kā atsaucē noteikšanas gadījumus vai kā atšķirīgus variantu noteikšanas gadījumus, ir aplami pozitīvi (false negative – FN).

- 2 Negatīvā procentuālā sakritība (Negative Percent Agreement – NPA) tiek aprēķināta kā proporcija ar analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā savvaļas tipus.
 - $(\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits}) / (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits})$
Analīzes ziņotie savvaļas tipu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi negatīvi (true negative – TN). Savvaļas tipu lokusi, kurus analīze ir ziņojusi kā variantus, ir aplami pozitīvi (false positives – FP).
- 3 Vispārējā procentuālā sakritība (Overall Percent Agreement – OPA) tiek aprēķināta kā proporcija no analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem pret standartmetodi.
 - $((\text{analīzes pareizi ziņoto variantu lokusu skaits}) + (\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits})) / ((\text{kopējais variantu lokusu skaits}) + (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits}))$
- 4 PPA, NPA un OPA aprēķinos nav iekļauti nenoteikšanas gadījumi (kad varianta vai atsaucē lokuss neatbilst vienam vai vairākiem kvalitātes filtriem). Divu pētījumu pareizu noteikšanas gadījumu procentuālā apjoma metrikā ir īpaši iekļauti nenoteikšanas gadījumi, un šī nenoteikšanas gadījumu iekļaušana ir atzīmēta piemērojamajās tabulās.
- 5 Noteikšanas koeficients tiek aprēķināts kā filtrus izturējušo lokusu kopējais skaits, dalīts ar kopējo skaitu pozīciju, kuras ir sekvencētas 1.–22. hromosomai; hromosomas X un Y tiek izslēgtas. Šajā metrikā nav ņemta vērā noteikšanas atbilstība atsaucē metodei.

Par veikspējas raksturlielumiem, kas saistīti ar pirmsanalītiskajiem faktoriem (piemēram, ekstrakcijas metodēm vai DNS ievadēm), sk. Lietošanas instrukcijas par piemērojamo bibliotēkas sagatavošanas metodi.

Paraugu indeksēšana

Paraugu indeksēšanas praimeru, kas ir pievienoti bibliotēkas sagatavošanas laikā, katrai parauga DNS piešķir unikālu sekvenci, ļaujot vairākus paraugus apvienot vienā sekvencēšanas izpildē. Paraugu indeksēšana tiek izmantota gan Germline, gan Somatic darbplūsmām.

Kopā 96 paraugu indeksi tika testēti ar reprezentatīvu analīzi, kura bija paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes katrai virknei visās 23 cilvēka hromosomās, lai verificētu, ka analīze konsistenti spēj veikt genotipa noteikšanu dotajam paraugam dažādās indeksēšanas praimeru kombinācijās. Y hromosomā nav uzticamu reģionu, un tā netika izvērtēta. Astoņi unikāli paraugi tika testēti ar 12 dažādām indeksēšanas praimeru kombinācijām katram paraugam. Paraugu rezultāti no Germline analīzes moduļa tika salīdzināti ar Platinum Genomes versiju 2016-01. PPA (SNV un indeli) pārsniedza 97% (patiesi pozitīvo noteikšanas gadījumu skaits bija vismaz 70 SNV, 38 insercijām, 36 delēcijām), un NPA bija 100% (vismaz 23 440 atsaucē pozīcijas katrai indeksēšanas kombinācijai) katrai no 96 indeksēšanas kombinācijām. Neatkarīgi tika testēts atsevišķs indekss, lai pārbaudītu, vai MiSeqDx reaģentu komplekta v3 sekvencēšanas ķīmija var atbalstīt mazāk par 8 paraugiem (iepriekšējās ķīmijas MiSeqDx universālajā komplektā 1.0 ierobežojums bija ne mazāk kā 8 paraugi). Atsevišķajam indeksam PPA vērtības bija 98,9 % (180/182) SNV, 100 % (38/38) insercijām un 100 % (46/46) delēcijām. NPA bija 100 % (23 856/23 856).

Tika testēti divpadsmit parauga atkārtojumi (24 bibliotēkas), lai izmērītu indeksa akurātumu ar somatiskajiem variantiem frekvencēs no 0,05 līdz 0,10, izmantojot moduli Somatic Variant Module (somaticajai noteikšanai tiek izmantotas 2 indeksēšanas kombinācijas katram atkārtojumam). PPA bija 100% SNV (64/64), insercijām (11/11) un delēcijām (19/19). NPA bija 100% (vismaz 11 590 atsaucē pozīcijas katrai indeksēšanas kombinācijai) visām indeksēšanas kombinācijām.

Paraugu pārņemšana

MiSeqDx instrumenta darbplūsmā ietver bibliotēkas sagatavošanu un vairāku paraugu sekvencēšanu, kā arī vienlaikus kontrolē apstrādi. Paraugu pārņemšanas pētījums tika veikts, lai novērtētu, vai testa rezultātus ietekmē kļūdaini pozitīvi rezultāti, kas saistīti ar piesārņošanu pārņemšanas laikā starp nodalījumiem, sagatavojot paraugu bibliotēku, kā arī piesārņošanu starp izpildes reizēm starp secīgām sekvencēšanas izpildēm. Tika izmantoti somatiski varianti, jo tos var noteikt zemākos alēles biežuma notikumos nekā dzimumšūnu variantus.

Paraugi sastāvēja no četriem genomu DNS paraugiem no šūnu līnijām, katrs saturēja dažādas paneļa mutācijas divu gēnu reprezentatīvajās analīzēs. Paraugi bija tādi, ka mutācijai vienā pozīcijā citās būs atsaucē (savvaļas tips) sekvenca citās.

Pārņemšana starp nodalījumiem tiek definēta kā kļūmes režīms, kuru, iespējams, rada manuālas apstrādes darbības (pipetēšana, paraugu sajaukšana utt.). Lai novērtētu pārņemšanu no viena parauga nodalījuma uz citu, tika veiktas divas testa izpildes.

- Augstas ievades genoma DNS (gDNS) parauga, kas satur mutāciju 1. gēnā, šaha dēlīša izkārtojums pamīšus ar zemas ievades gDNS paraugu, kas satur mutāciju 2. gēnā.
- Augstas ievades genoma gDNS parauga, kas satur mutāciju 2. gēnā, šaha dēlīša izkārtojums pamīšus ar zemas ievades gDNS paraugu, kas satur mutāciju 1. gēnā.

Katrā izpildē uz viltus pozitīvu rezultātu tika izvērtēti kopā 12 replikāti (piemēram, par 1. gēna mutācija, kas ziņota nodalījumā, kas paredzēts 2. gēna mutācijas paraugam, vai otrādi).

Pārņemšana starp vairākām izpildēm tiek definēta kā kļūmes režīms, kuru, iespējams, rada atlikumi no iepriekšējās sekvencēšanas izpildes. Lai noteiktu, vai starp sekvencēšanas reizēm notiek pārņemšana, tika sagatavotas divas plates, kurās katrā bija 11 replikāti no viena unikāla augstas ievades gDNS parauga un tukšs paraugs; tie tika secīgi sekvencēti vienā MiSeqDx instrumentā, un tika novērtēti viltus pozitīvi rezultāti. Pirmajā izpildē bija 2. gēna mutācijas parauga 11 replikāti un viens tukšs paraugs. Otrajā izpildē bija 1. gēna mutācijas parauga 11 replikāti un 1 tukšs paraugs. Vispirms tika sekvencēta 2. gēna mutācijas parauga bibliotēka, ar sekojošu sekvencēšanas izpildi, izmantojot 1. gēna mutācijas parauga bibliotēku, kam sekoja vēl viena 2. gēna mutācijas parauga bibliotēkas sekvencēšanas izpilde. Ja tiktu novērotas jebkādas 2. gēna mutācijas izpildē, kurā bija tikai 1. gēna mutācija, un otrādi, tas norādītu uz pārņemšanu.

Tika ziņots nulle viltus pozitīvu rezultātu (0/24, 0%), kas radušies pārņemot *starp nodalījumiem*. Tika atklātas visas paredzētās mutācijas. Tika ziņots nulle viltus pozitīvu rezultātu (0/24, 0%), kas radušies pārņemot *starp izpildēm*. Tika atklātas visas paredzētās mutācijas. Tika ziņots nulle viltus pozitīvu rezultātu (0/48, 0%), kas *kopā* radušies pārņemot (starp nodalījumiem un starp izpildēm kopā).

Dzimumšūnas veiktspējas raksturlielumi

Šeit aprakstītie pētījumi sekvencēšanas datu analizēšanai izmantoja Germline Variant Module, izņemot tos pētījumus, kuros tika izmantots viena gēna panelis — tajos tika izmantots analizēm specifisks modulis.

Precizitāte

Tālāk minētais pētījums tika veikts, lai novērtētu MiSeqDx instrumenta precizitāti, izmantojot MiSeqDx reaģentu komplektu v3 un augstas kvalitātes DNS. Pētījumā tika izmantotas reprezentatīvās analīzes, kas izstrādātas, lai apšaubītu dažādus gēnus, kas aptver 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās, izmantojot 150 amplikonus. Y hromosomā nav uzticamu reģionu, un tā netika izvērtēta. Šajā pētījumā izmantotie 12 unikālie paraugi nāk no vienas ģimenes — diviem vecākiem un 10 bērniem —, kurus sekvencēšanā bieži izmanto vairākās laboratorijās un sekvencēšanas metodoloģijās. Pieci paraugi ir no sievietēm un septiņi no vīriešiem. Katrs no paraugiem tika testēts divos eksemplāros. Precizitāte tika noteikta atsevišķu nukleotīdu variantiem (SNV), insercijām un delēcijām, salīdzinot pētījuma datus ar nodalījumam raksturīgu atsauces datu bāzi. Atsauces datu bāzes sekvence (Platinum Genomes versija 2016-01) tika iegūta no vairāku sekvencēšanas metodoloģiju kombinācijas, publiski pieejamiem datiem un informācijas par iedzimtību. Uzticami genoma reģioni tika definēti, pamatojoties uz šo atsauces metodi, ja vien nav norādīts citādi. Kopumā tika veikti 8 piegājieni; tabulas, kas parādītas, lai demonstrētu precizitāti, ir balstītas uz pirmā piegājiena datiem.

1. tabula satur pētījuma datus, kas parādīti ar pozitīvu un negatīvu procentuālo atbilstību attiecībā uz katru paraugu, kur varianta rezultāti tiek salīdzināti ar nodalījumam raksturīgu jauktu atsauces metodi PPA aprēķiniem. Trīs variantu tipi (SNV, insercijas un delēcijas) ir jaukti. Tā kā standartmetode nodrošina rezultātus tikai atsevišķiem nukleotīdu variantiem un insercijām/delēcijām, nevarianta bāzu rezultāti tiek salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvences uzbūvi hg19 NPA aprēķiniem.

1. tabula MiSeqDx instrumenta bāzes noteikšanas rezultātu atbilstība pa paraugiem

Paraugšs	Vidējais noteikšanas ātrums	Kopējais variāntu skaits	Kopējais TP variāntu skaits	Kopējais VN variāntu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	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
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

Reprezentatīvais tests sastāvēja no 150 amplikoniem, kas bija paredzēti, lai aptvertu daudzveidīgu genoma saturu. Amplikonu GC saturs svārstījās no 26 līdz 87 %. Amplikoniem bija arī virkne atsevišķu nukleotīdu (piemēram, PolyA, PolyT), dinukleotīdi un trinukleotīdu atkārtojumi. Dati tika apkopoti, par pamatu izmantojot amplikonus (2. tabula), lai noteiktu genoma satura ietekmi uz pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu veido variantu un atsaucis noteikšanas gadījumi, un, ja pastāv nepareizas noteikšanas vai beznoteikšanas gadījumi, tas ir mazāks par 100%. Noteikšana nenotiek, ja variantu noteikšanai nav izpildīts viens vai vairāki filtri (piemēram, nepietiekams pārklājums).

No astoņiem FN variantiem, kas redzami 2. tabulā, septiņiem notika 1 bp insercija 111. amplikonā, kas satur arī PolyA homopolimēru un GC saturu 0,29. Atlikušais 1 FN (nepareizais noteikšanas gadījums) notika gaidāmā heterozigotā SNV dēļ 125. amplikonā ar GC saturu 0,68, ko sauc par homozigotu variantu. SNV varianta frekvence bija 0,71, kas pārsniedz 0,70 sliekšni, lai klasificētu kā homozigotu variantu. Amplikons ar vismazāko pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu (98,2 %) bija 17. amplikons ar 40 noteikšanas gadījumiem un saturēja AT atkārtojumus un GC saturu 27 %.

2. tabula MiSeqDx instrumenta precizitāte amplikona līmenī

Amplikon	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliedziņos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36450499	36450591	93	93	Indels	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indels	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indels	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indels	0,28	2160	0	0	100

9	2	87003930	87004009	80	80	Indels	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nav	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Nav	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indels	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nav	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indels	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indels	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nav	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100

26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nav	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Nav	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indels	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indels	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indels	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indels	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nav	0,44	1752	0	0	100

44	7	66276100	66276187	88	88	Indels	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indels	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nav	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indels	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nav	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indels	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indels	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nav	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	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100

62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indels	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indels	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nav	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nav	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nav	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indels	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nav	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indels	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nav	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nav	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indels	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	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	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nav	0,49	1944	0	0	100

81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Nav	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indels	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indels	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	Nav	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indels	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indels	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indels	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indels	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indels	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nav	0,36	2184	0	0	100

100	15	89864274	89864343	70	70	Indels	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nav	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indels	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indels	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indels	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indels	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nav	0,37	2184	0	0	100

119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indels	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indels	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nav	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nav	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nav	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Nav	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nav	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indels	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indels	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indels	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indels	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indels	0,39	2088	0	0	100

138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indels	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nav	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indels	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nav	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indels	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nav	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	Nav
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	Nav
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nav

Varianti, kas nebija zvani, ir apkopoti 3. tabulā. Konkrētie filtri, kas izraisīja beznoteikšanas gadījumus, ir uzskaitīti tabulā. Ievietošana amplikonā 111 tika filtrēta 9 no 16 gadījumos, atlikušos septiņus gadījumus nosakot kā atsauci un tāpēc viltus negatīvus (VN).

3. tabula Beznoteikšanas gadījumu variantu kopsavilkums

Amplikons Nr.	Rakst.: Poz	Variants	Atbilstošais amplikona saturs	Filtrs	Izlaistie varianti	Paredzamie varianti	VN noteikšana
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: atkārtojumu filtrs. Variants ir filtrēts, ja viss variants vai tā daļa atkārtoti parādās atsaucē genomā blakus varianta pozīcijai. Nepieciešami vismaz 9 atkārtojumi atsaucē, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 5 bp.

Parauga NA12878 šūnu līnijai sekvenčēšanas rezultāti tika salīdzināti ar ļoti pārlicināto genotipu NA12878 genomam, ko noteica Nacionālais standartu un tehnoloģijas institūts (NIST) (v.2.19). No 150 amplikoniem 92 amplikoni bija pilnībā iekļauti ļoti uzticamajos genoma reģionos, 41 amplikonam bija daļēja pārklāšanās un 17 amplikoniem NIST sekvenčē nebija pārklāšanās. Rezultātā tika iegūti 10 000 koordinātu vienā replikatā salīdzināšanai. Nevariantu bāzes noteikšanas gadījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma atsaucē sekvenčes uzbūvi 19. Precizitātes rezultāti ir parādīti 4. tabulā.

4. tabula Atbilstība MiSeqDx instrumentu bāzes noteikšanas gadījumu rezultātiem NA12878 paraugam ar NIST datu bāzi

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas ātrums	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais VN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu nelielus ievietojumus un dzēsumus (indeli) (5. tabula). Dažos gadījumos indels bija izplatīts starp diviem vai vairākiem paraugiem, kā tas atspoguļots slejā "Kopējais parauga replikātu skaits ar indeli". Rezultāti abiem 12 derīgo paraugu replikātiem ir iekļauti 5. tabulā. Pavisam bija 71 indels, un šo indelu lielums bija diapazonā 1–24 bp insercijām un 1–25 bp delēcijām. 69 indelos katrā tika konstatēta 100% pozitīva procentuālā sakritība. Vienam dzēsumam (64 amplikoni; 2 bp dzēsumi (chr10 55892600 TAC> T)) nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo katram no šiem variantiem R5x9 filtra dēļ nebija noteikšanas gadījuma 5); tāpēc nevarēja aprēķināt PPA, kas izslēdz noteikšanas gadījumus. Arī citam indelam, 1 bp ievietošanai (chr17 39589692 C> CA amplikons 111) nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo 9 varianti bija bez noteikšanas gadījuma R5x9 filtra dēļ un 7 bija FN noteikšanas gadījumi.

5. tabula Kopsavilkums par indela noteikšanu ar instrumentu MiSeqDx

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indel	Kopējais paraugu skaits, kas replicējas ar indeli	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
1	1	36450544	93	25 bp dzēsums	GAAAATTT AATGAAACACA TTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp dzēsums	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp ievietojums	T>TTTTAAT AGCAAAAAG AGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp dzēsums	GACAGAC TGTGAGGA AGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp ievietojums	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp ievietojums	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp ievietojums	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100

9	2	87003972	80	6 bp dzēsums	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp ievietojums	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 bp ievietojums	C>CTGAAA ATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp ievietojums	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp dzēsums	TAACTTAA AATTACAAAA TAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp ievietojums	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp dzēsums	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp dzēsums	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp ievietojums	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp dzēsums	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp ievietojums	G> GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp dzēsums	CCCTGGG TGCTATAGC CCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp dzēsums	GCTT>G	14	0	0	14	100

39	6	32986905	95	25 bp dzēsums	CTTTCACT TTCCCCGTCTC ATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp dzēsums	GGCATGAG GCTTGGTGAC ATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp ievietojums	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp dzēsums	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp ievietojums	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp dzēsums	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 bp dzēsums	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp dzēsums	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp ievietojums	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp ievietojums	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp dzēsums	TCTGGGG GGCAGCCCC TGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp dzēsums	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp dzēsums	AGCGTCTAT AACCAAAT>A	12	0	0	12	100

64	10	55892600	89	2 bp dzēsums	TAC>T	10	10	0	0	Nav
68	11	30177690	70	2 bp ievietojums	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp ievietojums	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp dzēsums	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp dzēsums	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp ievietojums	T>TTCTCAG TACGGTGA ACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp ievietojums	C>CAAAA TATAAAAA GCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp ievietojums	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp dzēsums	ATCTATT TTCTAATA GACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp dzēsums	TTTAAAT TTGAATGTG ATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 bp ievietojums	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp dzēsums	CTTGCTCTAT AAACCGT>C	10	0	0	10	100

93	14	102808554	94	5 bp dzēsums	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp dzēsums	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp dzēsums	GCCCCTGAG CCAGCCTCCC GCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp ievietojums	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp ievietojums	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp dzēsums	ATTATTT>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp dzēsums	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp ievietojums	A>ATCCTATTC TACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp ievietojums	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp ievietojums	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp ievietojums	T>TTCTGA AGGCAAGTC TATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp dzēsums	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp dzēsums	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100

120	18	38837054	75	22 bp ievietojums	T>TGTATCT TAGCAAAAG TTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp ievietojums	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp dzēsums	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 bp dzēsums	TACTTGAGA ACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp ievietojums	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp ievietojums	G>GGAATGTCAGC C	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp dzēsums	TCCTGGCTG GCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp ievietojums	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp dzēsums	ACTCAAGATAACT CATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp dzēsums	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp ievietojums	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp ievietojums	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp dzēsums	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reproducējamība

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu MiSeqDx instrumenta precizitāti ar šūnu līnijām (1. un 2. pētījums) vai asinīm, kas novājinātas ar šūnu līnijām (2. pētījums). 1. pētījumā izmantoti vairāki instrumenti; diviem pētījumiem bija vairākas vietas.

1. pētījums

MiSeqDx instrumenta reproducējamība tika noteikta, izmantojot divus instrumentus, divus operatorus un divas reaģentu partijas kopumā astoņos piegājienu. Reprezentatīvās analīzes, paraugi un atsauces metode ir tie paši, kas aprakstīti precizitātes pētījumā.

Rezultāti parādīti katram instrumentam uz amplikona bāzes (6. 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 un kļūdainu noteikšanu atkarībā no konkrētā amplikona.

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

Amplikonss	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecināto reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
1	1	36450499	36450591	93	93	Indels	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indels	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indels	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0

6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indels	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indels	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Nav	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Nav	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indels	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Nav	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indels	0,49	6720	0	0	6720	0	0

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	Indels	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Nav	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Nav	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	Nav	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (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	Indels	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indels	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indels	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indels	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Nav	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indels	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indels	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90

48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Nav	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indels	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Nav	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indels	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indels	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Nav	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	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	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indels	0,35	9120	0	0	9120	0	0

64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indels	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Nav	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Nav	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Nav	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indels	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Nav	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indels	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Nav	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Nav	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indels	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	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	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Nav	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0

82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Nav	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indels	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indels	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	Nav	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indels	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indels	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indels	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indels	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0

98	15	85438263	85438334	72	71	Indels	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Nav	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indels	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Nav	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indels	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indels	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0

114	17	61502432	61502510	79	79	Indels	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (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	Nav	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indels	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indels	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Nav	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Nav	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Nav	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Nav	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Nav	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indels	0,63	9696	0	0	9696	0	0

132	20	50897302	50897368	67	67	Indels	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indels	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indels	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indels	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indels	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Nav	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indels	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Nav	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indels	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Nav	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	0	0	0

MiSeqDx instruments

149	Y	2655519	2655609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Reproducējamības pētījuma rezultāti tika analizēti par katru operatoru, izmantojot atšķirīgu biežumu (7. tabula). Šīs analīzes parādīja, ka atšķirīgs biežums starp operatoriem bija pastāvīgs. Tiek parādīts vidējais atšķirību biežums +/- 1 standartnovirze.

7. 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
Homozigots (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigots (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Katra parauga reproducējamības pētījumu rezultāti ir parādīti, apvienojot tos no visiem astoņiem izmēģinājumiem (8. tabula). Noteikšana tiek vērtēta katram variantu tipam — SNV, ievietojumiem un dzēsumiem — atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas. Šī analīze parādīja, ka variantu rezultāti bija reproducējami paraugos.

8. 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
NA 12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA 12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA 12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA 12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA 12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA 12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA 12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA 12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA 12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA 12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0

NA 12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA 12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

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

- GC saturs $\geq 19\%$ (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem ar 19% GC saturu, ar pareizu noteikšanas gadījumu un bez noteikšanas gadījumu biežumu $1,1\%$)
- GC saturs $\leq 78\%$ (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem ar 78% GC saturu, pareizi noteiktiem un bez noteiktiem)
- PolyA garums ≤ 8 (8 nukleotīdu PolyA atkārtojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyA = 8)
- PolyT garums ≤ 10 (10 nukleotīdu PolyT atkārtojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyT = 10)
- PolyG garums ≤ 7 (7 nukleotīdu PolyG atkārtojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyG = 7)
- PolyC garums ≤ 6 (PolyC atkārtojums no 6 nukleotīdiem tika pareizi noteikts 576 no 576 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyC = 6)
- Dinukleotīdu atkārtotā garums ir $\leq 11x$ (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem ar $11x$ dinukleotīdu atkārtojumiem tika noteiktas pareizi ar beznoteikšanas biežumu $0,5\%$)
- Trinukleotīdu atkārtotā garums ir $\leq 5x$ (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvencētiem amplikoniem ar $5x$ trinukleotīdu atkārtojumu) pareizi noteiktas ar $0,5\%$ beznoteikšanas biežumu)
- 24 vai mazāk bāzes ievietojumu un 25 vai mazāk bāzes dzēsumu
 - 24 bāzes ievietojumi tika pareizi noteikti 192 no 192 paraugiem
 - 25 bāzes dzēsumus pareizi noteica 223 paraugos un nepareizi noteica 1 paraugā no 224 paraugiem

2. pētījums

Dažādās vietās veikts reproducējamības pētījums, izmantojot reprezentatīvas analīzes, Illumina MiSeqDx cistiskās fibrozes 139-varianta analīzes, ietverot apakškopu *CFTR*, kliniski nozīmīgas ģenētiskās variācijas, kas analizētas ar MiSeq Reporter programmatūru, izmantojot MiSeqDx mērķa DNS sekvenčēšanas darbplūsmu (9. tabula). Aklajā pētījumā tika izmantotas 3 izmēģinājumu vietas un 2 operatori katrā vietā. Katrā vietā katrs operators testēja nodalījumam raksturīgus 46 paraugu paneļus, kopā 810 noteikšanas vienā vietā. Paneļi saturēja sajaukumu no genoma DNS no šūnu līnijām ar zināmajiem variantiem *CFTR* gēnā, kā arī no leukocītiem atbrīvotas asinis, kam pievienotas šūnu līnijas ar zināmiem *CFTR* gēna variantiem. Asins paraugi tika piegādāti, lai ļautu ietvert ekstrakcijas soļus, ko izmanto, lai sagatavotu gDNS, kas kalpo par galveno ievadi analīžu darbplūsmā. Paraugu atbilstības koeficients, kas definēts kā paraugu skaits, kas atbilst QC metrikai pirmajā mēģinājumā, bija 99,88%. Visu testa rezultātu pamatā ir sākotnē testēšana.

9. tabula Kopsavilkums reproducējamības pētījuma rezultātiem, kas veikts ar reprezentatīvo MiSeqDx cistiskās fibrozes 139-varianta analīzes

Paneļis	Paraugs #	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
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

Panelis	Pparaugs #	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
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 neparādās	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panelis	Pārbaugs #	Genotipa pārbaugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
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	Nav	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

Panelis	Pārbaugs #	Genotipa pārbaugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	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	Nav	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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

Panelis	Pārags #	Genotipa pārags	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
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	Nav	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	Nav	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	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	Nav	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	Nav	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	Nav	100	100

Panelis	Pār- raugs #	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteik- šanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbil- stoša noteik- šana (varianti)			Negatīva atbil- stoša noteik- šana (savvaļas tips)			Kļū- dainu noteik- šanu skaits	Bez- noteik- šanas gadījumu skaits	Pozi- tīva atbil- stība (%)	Nega- tīva atbil- stība (%)	Kopējā atbil- stība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	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	Nav	100	100

Panelis	Pārbaugs #	Genotipa pārbaugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
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	Nav	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
Kopā				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Savvaļas tipa atrašanās vieta, kas atbilst N1303K variantam vienā replikātā, izraisīja beznoteikšanas gadījumu nepietiekama pārklājuma dēļ.

² Vienam 5. un 75. parauga replikātam noteikšanas koeficients bija 0%. Turpmāka izmeklēšana norāda, ka paraugi, iespējams, nav pievienoti paraugu plātei pirms bibliotēkas sagatavošanas, jo mēģenēs atlikušie paraugu tilpumi atbilda tam, ka no tām nekas netika paņemts.

³ Pierādījumi liecina, ka operators visticamāk samainīja 9. un 10. paraugu pirms bibliotēkas sagatavošanas.

⁴ Savvaļas tipa atrašanās vieta, kas atbilst M1V variantam vienā replikātā katrā no diviem paraugiem, izraisīja beznoteikšanas gadījumu nepietiekama pārklājuma dēļ.

Somatiskās veiktspējas raksturlielumi

Šeit aprakstītie pētījumi sekvenčēšanas datu analizēšanai izmantoja moduli Somatic Variant Module, izņemot tos pētījumus, kuros tika izmantots 2 gēnu panelis — tajos tika izmantots analizēm specifisks modulis.

Precizitāte

Tika veikti trīs pētījumi, lai novērtētu MiSeqDx instrumentu, izmantojot DNS, kas iegūta no FFPE paraugiem.

1. pētījums

Pētījumā tika izmantotas reprezentatīvās analīzes, kas izstrādātas, lai apšaubītu dažādus gēnus, kas aptver 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās, izmantojot 150 amplikonus. Y hromosomā nav uzticamu reģionu, un tā netika izvērtēta. Šajā pētījumā izmantotie pieci unikālie paraugi nāk no vienas ģimenes – diviem vecākiem un trīs bērniem –, kurus sekvenčēšanā bieži izmanto vairākās laboratorijās un sekvenčēšanas metodoloģijās. Trīs paraugi ir no sievietēm un divi no vīriešiem. Pirms DNS ekstrahēšanas pētījumam visi paraugi tika fiksēti formalinā un iegulti parafinā. Paraugs GM12877 DNS līmenī tika atšķaidīts ar paraugu GM12878, lai izveidotu GM12877-D un izstrādātu variantu kopu ar frekvencēm tuvu 5% un 10%. Katrs no paraugiem tika testēts divos eksemplāros, izņemot GM12877-D, kas tika testēts ar pieciem atkārtojumiem. Precizitāte tika noteikta atsevišķu nukleotīdu variantiem (SNV), insercijām un delēcijām, salīdzinot pētījuma datus ar nodalījumam raksturīgu atsauces datu bāzi. Atsauces datu bāzes sekvenču (Platinum Genomes versija 2016-01) tika iegūta no vairāku sekvenčēšanas metodoloģiju kombinācijas, publiski pieejamiem datiem un informācijas par iedzimtību. Uzticami genoma reģioni tika definēti, pamatojoties uz šo atsauces metodi, ja vien nav norādīts citādi. Kopumā tika veiktas astoņas paraugu izpildes; tabulas, kurās attēloti akurātuma rādītāji, ir balstītas uz pirmās izpildes datiem.

10. tabula satur pētījuma datus, kas parādīti ar pozitīvu un negatīvu procentuālo atbilstību attiecībā uz katru paraugu, kur varianta rezultāti tiek salīdzināti ar nodalījumam raksturīgu jauktu atsauces metodi PPA aprēķiniem. Trīs variantu tipi (SNV, insercijas un delēcijas) ir jaukti. Tā kā standartmetode nodrošina rezultātus tikai atsevišķiem nukleotīdu variantiem un insercijām/delēcijām, nevarianta bāzu rezultāti tiek salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvenču uzbūvi hg19 NPA aprēķiniem.

10. tabula MiSeqDx instrumenta bāzes noteikšanas rezultātu atbilstība 6 labi raksturotu paraugu atsauces datiem

Paraugi	Vidējais noteikšanas ātrums	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais VN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	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 Varianti ar frekvenci, kas lielāka par 20 %.

² Variants ar frekvenci, kas mazāka par 20 %.

Tika izstrādāti 150 amplikoni, lai aptvertu dažādu genoma saturu. Amplikonu GC saturs svārstījās no 26 līdz 87 %. Amplikoniem bija arī virkne atsevišķu nukleotīdu (piemēram, PolyA, PolyT), dinukleotīdu un trinukleotīdu atkārtojumu. Testā tika izmantoti 6 unikāli paraugi. Dati tika apkopoti, par pamatu izmantojot amplikonus (11. tabula), lai noteiktu genoma satura ietekmi uz pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu veido variantu un atsaucēs noteikšanas gadījumi, un, ja pastāv nepareizas noteikšanas vai beznoteikšanas gadījumi, tas ir mazāks par 100%. Noteikšana nenotiek, ja variantu noteikšanai nav izpildīts viens vai vairāki filtri (piemēram, nepietiekams pārklājums). Nebija nepareizu noteikšanu. Beznoteikšanas gadījumu skaits amplitūdās ievērojami atšķirās. GC saturs un vairākas mijiedarbības ar GC saturu bija visnozīmīgākie beznoteikšanas gadījumu prognozētāji. 2040/2580 (79 %) no beznoteikšanas gadījumiem bija saistīti ar pārklājuma specifiskācijas neatbilstību. Amplikoni, kuru GC saturs pārsniedz 78 %, izsauca visvairāk beznoteikšanas gadījumu. Reprezentatīvajā amplikonā ar 78 % GC saturu kopumā 675 noteikšanas gadījumu nenotika. Reprezentatīvā amplikonā ar 87 % bija 1365 beznoteikšanas gadījumu. Pārklājumu var palielināt, samazinot paraugu skaitu, kas ielādēti plūsmas šūnā, un tas var ļaut noteikt amplikonus ar augstu GC saturu.

11. tabula Amplikona līmeņa precizitātes dati

Amplikon	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecināšanos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36450499	36450591	93	93	Indels	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indels	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indels	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indels	0,28	1350	0	0	100

9	2	87003930	87004009	80	80	Indels	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nav	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Nav	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indels	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Nav	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indels	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indels	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nav	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100

26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Nav	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	Nav	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indels	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indels	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indels	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indels	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nav	0,44	1095	0	0	100

44	7	66276100	66276187	88	88	Indels	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indels	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nav	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indels	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nav	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indels	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indels	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Nav	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100

62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indels	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indels	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Nav	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nav	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nav	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indels	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nav	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indels	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nav	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nav	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indels	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	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	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nav	0,49	1215	0	0	100

81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Nav	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indels	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indels	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	Nav	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indels	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indels	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indels	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indels	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indels	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nav	0,36	1365	0	0	100

100	15	89864274	89864343	70	70	Indels	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nav	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indels	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indels	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indels	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indels	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (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	Nav	0,37	1365	0	0	100

119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indels	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indels	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nav	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nav	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Nav	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nav	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nav	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indels	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indels	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indels	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indels	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indels	0,39	1305	0	0	100

138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indels	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Nav	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indels	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nav	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indels	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nav	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	Nav
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	Nav
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nav

Varianti, kas nebija zvani, ir apkopoti 12. tabulā. Konkrētie filtri, kas izraisīja beznoteikšanas gadījumus, ir uzskaitīti tabulā.

12. tabula Beznoteikšanas gadījumu variantu kopsavilkums

Amplikons Nr.	Rakst.: Poz	Variants	Atbilstošais amplikona saturs	Filtrs	Izlaistie varianti	Paredzami varianti
28	5:1882129	T> G	78% GC	ZemsDP ¹		13
52	8:24811064	AG> A	PolyG (7), CTC (4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C> T	PolyGC (3), 87% GC	ZemsDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC (11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C> CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ ZemsDP: zems pārklājums. Variants tiek filtrēts, ja dziļums vismaz vienā no kopām šajā konkrētajā pozīcijā ir zem 900.

² R3x6: atkārtojumu filtrs. Variants ir filtrēts, ja viss variants vai tā daļa atkārtoti parādās atsaucēs genomā blakus varianta pozīcijai. Nepieciešami vismaz seši atkārtojumi atsaucē, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 3 bp.

Parauga šūnu līnijai sekvenčēšanas rezultāti tika salīdzināti ar ļoti pārlicinošu genotipu NA12878 genomam, ko noteica Nacionālais standartu un tehnoloģijas institūts (NIST) (v.2.19). No 150 amplikonu 92 amplikoni bija pilnībā iekļauti ļoti uzticamajos genoma reģionos, 41 amplikonam bija daļēja pārklāšanās un 17 amplikonu NIST sekvenčē nebija pārklāšanās. Rezultātā tika iegūti 10 000 koordinātu vienā replikātā salīdzināšanai. Nevariantu bāzu noteikšanas gadījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvenčes uzbūvi hg19. Precizitātes rezultāti ir parādīti 13. tabulā.

13. tabula MiSeqDx instrumenta bāzes noteikšanas rezultātu atbilstība GM12878 paraugam

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas ātrums	Kopējais TP variantu noteikšanu skaits	Kopējais FN variantu noteikšanu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Šie pieci neatšķaidītie paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu mazas insercijas un delēcijas (indelus) (14. tabula). Dažos gadījumos indels bija izplatīts starp diviem vai vairākiem paraugiem, kā tas atspoguļots slejā "Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu". Rezultāti abiem piecu paraugu atkārtojumiem ir iekļauti 14. tabulā. Pavisam bija 71 indels, un šo indelu lielums bija diapazonā 1–24 bp insercijām un 1–25 bp delēcijām. 68 indelos katrā tika konstatēta pozitīva procentuālā sakritība 1. Trijām insercijām un delēcijām nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo katrs no šiem variantiem R3x6 filtra dēļ bija beznoteikšanas gadījums; tāpēc nevarēja aprēķināt PPA, kas izslēdz beznoteikšanas gadījumus. Trīs varianti bija 1 bp delēcija (chr8 24811064 AG>A); 2 bp delēcija (chr10 55892600 TAC>T) un 1 bp insercija (chr17 39589692 C>CA).

14. tabula Kopsavilkums par indela noteikšanu ar instrumentu MiSeqDx

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indel	Kopējais paraugu skaits, kas replicējas ar indelu	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
1	1	36450544	93	25 bp dzesums	GAAAATTTAATGAA ACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp dzesums	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp ievietojums	T>TTTTAATAGCAA AAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp dzesums	GACAGACTGT GAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp ievietojums	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp ievietojums	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp ievietojums	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp dzesums	TTATCTC>T	11	0	0	11	100

13	2	200796749	87	5 bp ievietojums	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp ievietojums	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 bp ievietojums	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp dzēsums	TAACTTAAAATTA CAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp ievietojums	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp dzēsums	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp dzēsums	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp ievietojums	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp dzēsums	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp ievietojums	G> GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp dzēsums	CCCTGGGTGCTA TAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp dzēsums	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp dzēsums	CTTCACTTCCC GTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp dzēsums	GGCATGAGGCTTGG TGACATGGCA>G	11	0	0	11	100

44	7	66276142	88	1 bp ievietojums	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp dzēsums	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp ievietojums	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp dzēsums	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp dzēsums	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 bp dzēsums	AG>A	15	15	0	0	Nav
53	8	76518677	67	4 bp ievietojums	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp ievietojums	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp dzēsums	TCTGGGGGGCAG CCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp dzēsums	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp dzēsums	AGCGTCTATAACCAAAT >A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp dzēsums	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp ievietojums	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp ievietojums	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100

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. Reprerzentatīvās 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 sekvenčētiem 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 sekvenčētiem 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 sekvenčētiem amplikoniem, kas satur PolyA = 8)
- PolyT garums ≤ 10 (10 nukleotīdu PolyT atkārtojums tika pareizi noteikts 120 no 120 sekvenčētiem amplikoniem, kas satur PolyT = 10)
- PolyG garums ≤ 6 (6 nukleotīdu PolyG atkārtojums tika pareizi noteikts 720 no 720 sekvenčētiem amplikoniem, kas satur PolyG = 6)
- PolyC garums ≤ 6 (PolyC atkārtojums no 6 nukleotīdiem tika pareizi noteikts 359 no 360 sekvenčētiem amplikoniem, kas satur PolyC = 6, un 1 bez noteikšanas)
- Dinukleotīdu atkārtotās garums ir $\leq 4x$ (visas noteiktās bāzes 600 no 600 sekvenčētiem 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 piegājenā) 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 piegājenā vai, testējot paraugos piegājenos, 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 publicēt, 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 PROGRAMMATŪRAS), 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*.