

„MiSeqDx[®]“ prietaisas

NAUDOTI „IN VITRO“ DIAGNOSTIKAI

Katalogo Nr. DX-410-1001

Numatytoji paskirtis

„MiSeqDx“ prietaisas skirtas tikslinei DNR bibliotekų, gautų iš žmogaus genomo DNR, išskirtos iš periferinio visos sudėties kraujo arba formalinu fiksuoto, į parafiną įlieto (FFPE) audinio, sekai nustatyti, prietaisu atliekant *in vitro* diagnostikos (IVD) tyrimus. „MiSeqDx“ prietaisas nėra skirtas naudoti atliekant viso genomo ar *de novo* sekos nustatymą. „MiSeqDx“ prietaisą reikia naudoti su registruotais ir nurodytais, leistais naudoti ar patvirtintais IVD reagentais ir analitine programine įranga.

Procedūros principai

„Illumina MiSeqDx“ yra skirtas tiksliniam pakartotiniam žmogaus DNR sekos nustatymui naudojant „Illumina“ sekos nustatymo eksploatacines medžiagas ir bibliotekas, paruoštas iš žmogaus genomo DNR, išskirtos iš periferinio visos sudėties kraujo arba FFPE audinio, bei naudojant registruotus ir nurodytus, leistus naudoti arba patvirtintus IVD reagentus. Bibliotekos paruošiamos amplifikuojant taikinius ir pridėdant mėginių indeksų bei užfiksuotų sekų. Mėginių bibliotekos užfiksuojamos pratekamojoje kiuvetėje ir jų sekos nuskaitomos prietaise naudojant sekos nustatymą sintezės (SBS) chemijos būdu. Taikant SBS chemijos būdą, naudojamas ciklinio grįžtamojo blokavimo metodas siekiant aptikti pavienių nukleotidų bazes, kurios yra įtrauktos į augančias DNR gijas. Analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai kiekvieno sekos nustatymo ciklo bazei priskiria kokybės įvertį. Pasibaigus pirminei analizei, atliekant antrinę analizę „MiSeqDx“ prietaise apdorojami bazių priskyrimai. Apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, prilygiavimą, variantų priskyrimą ir variantų priskyrimo formato (VCF) failų, kuriuose pateikiama informacija apie variantus, randamus konkrečiose referentinio genomo padėtyse, generavimą. „MiSeqDx“ naudoja skirtingus antrinės analizės modulius – tai priklauso nuo darbo eigos. Taip pat galimi gonocitų linijos arba somatinių variantų priskyrimo darbo eigų moduliai ir moduliai, skirti konkrečios numatytosios paskirties tyrimams.

Dvejopo paleidimo konfigūracija

Dvejopo paleidimo konfigūracija apima aparatinę, programinę įrangą ir diegimo procedūras, kad „MiSeqDx“ prietaisas galėtų vykdyti tiek *in vitro* diagnostikos (IVD), tiek tik moksliniams tyrimams naudojamus (RUO) sekos nustatymo tyrimus. Naudojamas dvejopo paleidimo konfigūraciją, naudotojas gali diagnostinį prietaiso režimą perjungti į mokslinių tyrimų režimą ir atvirkščiai. Ant sekos nustatymo eksploatacinių medžiagų nurodyti RFID neleidžia RUO sekos nustatymo reagentų naudoti diagnostiniuose sekos nustatymo vykdymuose.

Procedūros apribojimai

- 1 Naudoti *in vitro* diagnostikai.
- 2 Etiketėse pateikiami rezultatai buvo gauti naudojant reprezentatyviojo tyrimo grupes ir periferinį visos sudėties kraują arba ląstelių linijas (gonocitų linijos charakteristikos) ir FFPE audinį arba FFPE ląstelių linijas (somatinių variantų charakteristikos) bei aprašytus reagentus ir programinės įrangos modulius. Veikimo charakteristikos pateikiamos tik informaciniais tikslais. Pateikiami tikrinimo tyrimai, kurių reikalaujama naudojant didelio pralaidumo DNR sekos analizatorių specialias kontrolines medžiagas, tik iliustruoja prietaiso bendrąsias galimybes ir neapibrėžia prietaiso galimybių ar tinkamumo, susijusių su konkrečiais teiginiais. Reikia patikrinti visus visų su šiuo instrumentu naudoti sukurtų diagnostinių tyrimų veikimo aspektus.
- 3 Šio gaminio galimybės yra tik tokios, kokios nurodytos toliau.
 - Sekos nustatymo išvestis ≥ 5 Gb
 - Filtrą praėjusių nuskaitymų ≥ 15 mln.

- Nuskaitymo ilgis (pagal galą suporuotas vykdymas) – 2 x 150 bp
 - Bazės, didesnės nei Q30 \geq 80 %, kai nuskaitymo ilgis – 2 x 150 bp
Ne mažiau kaip 80 % bazių „Phred“ kokybės įverčiai didesni nei 30, o tai nurodo didesnę nei 99,9 % bazių priskyrimo tikslumą.
- 4 „MiSeqDx“ prietaisas patvirtintas tik žmogaus DNR bibliotekų, išskirtų iš periferinio visos sudėties kraujo ir FFPE audinio, sekai nustatyti. Bibliotekų, generuotų iš kitų tipų mėginių, šiame prietaise atliekant *in vitro* diagnostiką naudoti negalima. Šio prietaiso veikimo charakteristikos norint atlikti iš klinikinių mėginių gautų mikrobinių nukleorūgščių sekos nustatymą nenustatytos.
- 5 „MiSeqDx“ yra skirtas *in vitro* diagnostikai, naudojant registruotus ir nurodytus, leistus naudoti arba patvirtintus IVD reagentus ar tyrimus. „MiSeqDx“ prietaisą galima naudoti *in vitro* diagnostikai naudojant tolesnius IVD tyrimus ar registruotus reagentus.

Pavadinimas	Katalogo Nr.	Pakuotės lapelio dokumento Nr.
„Praxis® Extended RAS“ skydelis (tik JAV)	20012431	1000000037190
„MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimas	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
„MiSeqDx“ cistinės fibrozės kliniškinis sekos nustatymo tyrimas	DX-102-1001	15038344
„TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“	20005718	1000000029772
„MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinys	20012552 / 20037124	1000000030849

Universalieji reagentų apribojimai ir veikimo charakteristikos, aprašyti šiame pakuotės lapelyje, paremti reprezentatyviaisiais tyrimais. Norėdami sužinoti IVD tyrimų paskirtį, aptinkamus variantus ir mėginių tipą, žr. konkretaus tyrimo pakuotės lapelį.

- 6 Tyrimo programinė įranga neprilygiuoja intarpų, išskirtų ar jų derinių turinio, kurio ilgis yra didesnis nei 25 bp. Todėl tyrimo programinė įranga neaptinka didesnio nei 25 bp ilgio intarpų / išskirtų.
- 7 Patvirtinta, kad sistema gali aptikti vieno nukleotido variantus (SNV) ir iki 25 bp iškritas bei 24 bp intarpus, kai naudojama su „Germline Variant“ ir „Somatic Variant“ modulių programine įranga. Atliekant somatinį priskyrimą (taikant 0,05 variantų dažnį), buvo aptikta 25 bp išskirtų ir 18 bp intarpų.
- 8 Tyrimo programinė įranga gali neprilygiuoti amplikonų nuskaitymų, kurių variantų turinys yra itin didelis, todėl sritis gali būti laikoma nemutantinio tipo. Itin didelio turinio pavyzdžiai:
- nuskaitymai, kuriuose yra daugiau nei trys intarpai / iškritos,
 - mažiausiai 30 bp ilgio nuskaitymai su SNV turiniu, kurio ilgis yra didesnis nei 4 % viso amplikono tikslinio ilgio (išskyrus zondo sritis), ir
 - nuskaitymai, kurių ilgis mažesnis nei 30 bp, o SNV turinys didesnis nei 10 % viso amplikonų ilgio (įskaitant zondo sritis).
- 9 Dideli variantai, įskaitant multinukleotidų variantus (MNV) ir didelius intarpus / iškritas, išvestiniame VCF faile gali būti pateikiami kaip atskiri mažesni variantai.
- 10 Išskirtų variantai gali būti išfiltruojami arba praleidžiami, kai apimtyje yra išdėstyti du amplikonai, jei išskirtos ilgis yra didesnis už persidengimą tarp išdėstytų amplikonų arba lygus jam.
- 11 Sistema negali aptikti intarpų / išskirtų, jei jie yra tiesiogiai šalia pradmens ir nėra persidengiančių amplikonų. Sričių, kuriuose yra persidengiančių amplikonų, tyrimas negali aptikti išskirtų, kai persidengimo sritis yra mažesnė už aptinkamo dydžio iškritą. Pavyzdžiui, jei dviejų gretimų amplikonų persidengimo sritis yra dvi (2) bazės, tyrimas negali aptikti jokių išskirtų, apimančių abi šias bazes. Galima aptikti vienos bazės iškritą bet kurioje iš šių bazių.
- 12 Kaip ir bet kokioje hibridizavimu pagrįstoje bibliotekos paruošimo darbo eigoje, pagrindiniai polimorfizmai, mutacijos, intarpai ar iškritos oligonukleotidus rišančiose srityse gali turėti įtakos zonduojamiems aleliams ir atitinkamai sekos nustatymo metu atliekamiems priskyrimams. Pavyzdžiui:
- variantas fazėje gali būti neamplifikuotas su variantu pradmens srityje, todėl rezultatas gali būti klaidingai neigiamas,
 - variantai pradmens srityje gali užkirsti kelią referentinio alelio amplifikacijai, todėl gali įvykti neteisingas homozigotinio varianto priskyrimas,

- intarpų / iškritų variantai pradmenų srityje gali sukelti klaidingą teigiamą priskyrimą nuskaitymo pabaigoje šalia pradmens.
- 13 Intarpai / iškritus gali būti filtruojami dėl gijų tendencingumo, jei jie atsiranda ties vieno nuskaitymo pabaiga ir atliekant lygiavimą nėra prilygiuojami, tačiau nepašalinami.
- 14 Maži MNV nepatvirtinti.
- 15 Kopijų skaičiaus variantai ir struktūriniai variantai, pvz., suliejimai ar perkėlimai, nepatvirtinti.
- 16 Specifiniai „Germline“ apribojimai
 - „MiSeqDx“ sistema, naudojanti „Germline Variant“ modulį, yra skirta kokybiniais gonocitų linijos variantų priskyrimo rezultatams pateikti (t. y. homozigotinio, heterozigotinio, nemutantinio tipo).
 - Naudojant kartu su „Germline Variant“ modulių, mažiausia reikalinga aprėptis vienam amplikonui, kad būtų tiksliai priskirtas variantas, yra 150x. Mėginių skaičius ir bendras tikslinių bazių skaičius turi įtakos aprėpčiai. GC kiekis ir kitas genomo turinys gali turėti įtakos aprėpčiai.
 - Kopijų skaičiaus kitimas gali turėti įtakos tam, ar variantas identifikuojamas kaip homozigotinis, ar heterozigotinis.
 - Variantai tam tikruose pasikartojančiuose kontekstuose yra išfiltruojami VCF failuose. Kartotinis RMxN filtras naudojamas variantams filtruoti, jei visa variantų seka ar jos dalis pakartotinai matoma referenciniame genome šalia varianto padėties. Kai atliekamas gonocitų linijos varianto priskyrimas, norint filtruoti variantą, reikia bent 9 referentinio geno pakartojimų, ir tinka tik pakartojimai, ne ilgesni kaip 5 bp (R5x9).
- 17 Specifiniai „Somatic“ apribojimai
 - „MiSeqDx“ sistema, naudojanti „Somatic Variant“ modulį, yra skirta somatinių variantų priskyrimo kokybiniais rezultatams pateikti (t. y. nustatoma, ar yra somatinis variantas, kurio varianto dažnis yra ne mažesnis nei 0,026, o aptikimo riba yra 0,05).
 - Naudojant kartu su „Somatic“ variantų modulių, mažiausia reikalinga aprėptis vienam amplikonui, kad būtų gautas tikslaus varianto priskyrimas, yra 450x vienam oligonukleotidų telkiniui. Mėginių skaičius ir bendras tikslinių bazių skaičius turi įtakos aprėpčiai. GC kiekis ir kitas genomo turinys gali turėti įtakos aprėpčiai.
 - Variantai tam tikruose pasikartojančiuose kontekstuose yra išfiltruojami VCF failuose. Kartotinis RMxN filtras naudojamas variantams filtruoti, jei visa variantų seka ar jos dalis pakartotinai matoma referenciniame genome šalia varianto padėties. Kai atliekamas somatinio varianto priskyrimas, norint filtruoti variantą, reikia bent 6 referentinio geno pakartojimų, ir tinka tik tie pakartojimai, kurių ilgis yra iki 3 bp (R3x6).
 - „Somatic“ variantų modulis negali atskirti gonocitų linijos ir somatinių variantų. Modulis naudojamas norint aptikti variantus plataus intervalo variantų dažniuose, tačiau varianto dažnis negali būti naudojamas norint atskirti somatinius variantus nuo gonocitų linijos variantų.
 - Normalus mėginio audinys turi įtakos variantų aptikimui. Į ataskaitą įtraukta aptikimo riba yra pagrįsta santykinio varianto dažniu, nustatyta pagal visą DNR, gautą iš naviko ir normalaus audinio.

Gaminio komponentai

„Illumina MiSeqDx“ sudaro toliau nurodyti komponentai.

„MiSeqDx“ prietaisas (katalogo Nr. DX-410-1001)

Kad „MiSeqDx“ prietaisas veiktų ir būtų galima analizuoti duomenis, reikalingi toliau nurodyti programinės įrangos komponentai.

Programa	Funkcija	Aprašas
„MiSeq“ operacinė programinė įranga (MOS)	Valdo prietaiso veikimą	MOS programa valdo prietaiso veikimą sekos nustatymo metu ir generuoja vaizdus, skirtus naudoti analizės realiuoju laiku (RTA) programinei įrangai. Norėdami gauti daugiau informacijos, žr. „MiSeqDx“ prietaiso informacinį vadovą 2 v. MOS sistemai (dokumento Nr. 100000021961).
Analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga	Atlieka pirminę analizę	RTA programa kiekvienos išklotinės vaizdus, kuriuos MOS generuoja vieno sekos nustatymo vykdymo ciklo metu, konvertuoja į bazių priskyrimo failus, kurie įvedami į „Local Run Manager“ analizės modulius. RTA programoje nėra naudotojo sąsajos.
„Local Run Manager“	Modulio pasirinkimo sąsaja	„Local Run Manager“ programinė įranga yra į prietaisą integruotas sprendimas, skirtas naudotojams tvarkyti, antrinei analizei vykdyti ir būsenai stebėti. Norėdami gauti daugiau informacijos, žr. „Local Run Manager“ programinės įrangos informacinį vadovą, skirtą „MiSeqDx“ prietaisui (dokumento Nr. 1000000011880).
„Somatic Variant“ modulis	Atlieka antrinę analizę	Ši „Local Run Manager“ analizės modulio programinė įranga atlikdama antrinę analizę apdoroja bazių priskyrimus. Apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, lygiavimą, variantų priskyrimą ir ataskaitų kūrimą. Variantų priskyrimo priemonė („Piscis“) generuoja VCF failus, kuriuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse, ir nurodytas išmatuotas variantų dažnis.
„Germline Variant“ modulis	Atlieka antrinę analizę	Ši „Local Run Manager“ analizės modulio programinė įranga atlikdama antrinę analizę apdoroja bazių priskyrimus. Apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, lygiavimą, variantų priskyrimą ir ataskaitų kūrimą. Variantų priskyrimo priemonė („Piscis“) generuoja VCF failus, kuriuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse, ir nustato, ar konkretus variantas yra heterozigotinis, ar homozigotinis.

Laikymas ir naudojimas

Elementas	Specifikacija
Temperatūra	Transportavimas ir laikymas: nuo -10 °C iki 40 °C (14–104 °F) Naudojimo sąlygos: 19–25 °C (66–77 °F)
Drėgnis	Transportavimas ir laikymas: drėgnis be kondensacijos Naudojimo sąlygos: 30–75 % santykinis drėgnis (be kondensacijos)

Reikalinga įranga ir medžiagos, nepridėta

Sekos nustatymo eksploatacinės medžiagos

„MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinys (katalogo Nr. 20012552 / 20037124)

Naudotojo pateikiamos eksploatacinės medžiagos

Prieš pradėdami vykdymą įsitikinkite, kad turite tolesnes naudotojo pateikiamas eksploatacines medžiagas.

Eksploatacinė medžiaga	Paskirtis
Alkoholio servetėlės, 70 % izopropilas arba Etanolis, 70 %	Pratekamosios kiuvetės stiklo ir platformos valymas
Laboratorinis audinys, kurio sudėtyje mažai medvilnės	Pratekamosios kiuvetės platformos valymas
Popierius lėšiams, 4 x 6 col.	Pratekamosios kiuvetės valymas
„Tween 20“	Prietaiso plovimas
Pincetas, plastikinis, kvadratinis galiuku (papildomas)	Pratekamosios kiuvetės išėmimas iš jos gabenimo taros
Vanduo, laboratorinis	Prietaiso plovimas

Laboratorinio vandens gairės

Prietaiso procedūroms atlikti visada naudokite laboratorinį vandenį. Niekada nenaudokite vandentiekio vandens. Visi toliau pateikti pavyzdžiai yra priimtini.

- „Illumina PW1“
- 18 megaomų (MΩ) vanduo
- „Milli-Q“ vanduo
- „Super-Q“ vanduo
- Molekulinės biologijos vanduo

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

DĖMESIO

Pagal federalinius įstatymus šį prietaisą leidžiama parduoti ar užsakyti tik gydytojui ar kitam specialistui, kuriam išduota licencija naudoti ar užsakyti prietaiso naudojimo paslaugą pagal valstijos, kurioje jis (ji) verčiasi medicinos praktika, įstatymus.

- 1 **Kai kuriuose reagentų, kuriuos „Illumina“ teikia naudoti su „MiSeqDx“ prietaisu, komponentuose yra cheminių medžiagų, kurios gali būti pavojingos. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalata. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų.** Aplinkosaugos, sveikatos ir saugos informacijos ieškokite saugos duomenų lape adresu support.illumina.com/sds.html.
- 2 Su visais kraujo mėginiais dirbkite, taip, tarytum būtų žinoma, kad jie yra užkrėsti žmogaus imunodeficitu virusu (ŽIV), žmogaus hepatito B virusu (HBV) ir kitais krauju pernešamais patogeniniais agentais (bendros atsargumo priemonės).
- 3 Nesilaikant nurodytų procedūrų, rezultatai gali būti klaidingi arba gali gerokai pablogėti mėginių kokybė.
- 4 Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir rinkinių reagentais, mūvėkite vienkartinės pirštines bei dėvėkite laboratorinius chalatus. Baigę dirbti su mėginiais ir rinkinių reagentais, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- 5 Kad PGR produktai neužterštų reagentų, instrumentų ir genomo DNR mėginių, būtina laikytis tinkamos laboratorinės praktikos ir laboratorinės higienos taisyklių. PGR užteršimas gali lemti netikslius ir nepatikimus rezultatus.
- 6 Norėdami išvengti užteršimo, užtikrinkite, kad prieš amplifikaciją ir po jos būtų naudojama speciali įranga (pvz., pipetės, pipečių antgaliai, šilumos blokai, maišytuvai ir centrifugos).
- 7 Indekso ir mėginio pora turi tiksliai sutapti su atspausdintu plokštelės išdėstymu. „Local Run Manager“ automatiškai įveda indeksų pradmenis, susietus su mėginių pavadinimais (kai jie įvedami į modulį). Naudotojui patariama prieš pradedant sekos nustatymo vykdymą patikrinti indeksų pradmenis, susietus su mėginiais. Nesutampant mėginių ir plokštelės išdėstymo rezultatams, prarandama teigiamų mėginių identifikacija ir pateikiami neteisingi rezultatai.
- 8 Siekiant kompiuterį apsaugoti nuo virusų, naudotojui primygtinai rekomenduojama įdiegti savo antivirusinę programinę įrangą. Diegimo instrukcijas žr. naudotojo vadove.
- 9 Nenaudokite „MiSeqDx“, jei nuimtas bet kuris skydelis. Jei prietaisas naudojamas nuėmus bet kokius skydelius, kyla linijos įtampos ir nuolatinės srovės įtampos poveikio pavojus.
- 10 Nelieskite pratekamosios kiuvetės platformos, esančios pratekamosios kiuvetės skyriuje. Šiame skyriuje esančio šildytuvo veikimo temperatūra yra 22–95 °C, todėl jis gali nudeginti.
- 11 Prietaisas sveria apie 57 kg (126 svar.) ir gali sukelti sunkų sužeidimą, jei jis nukristų ar būtų netinkamai naudojamas.

Naudojimo instrukcijos

Toliau pateiktose „MiSeqDx“ prietaiso naudojimo instrukcijose reikalaujama naudoti „MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinyje esančius reagentus.

Vykdymo kūrimas naudojant „Local Run Manager“

Išsamias instrukcijas rasite „Local Run Manager“ programinės įrangos informaciniame vadove, skirtame „MiSeqDx“ prietaisui (dokumento Nr. 1000000011880), ir naudojamo analizės modulio „Local Run Manager“ vadove.

- 1 Pasirinkite **Create Run** (kurti vykdymą) ir „Local Run Manager“ modulį „Somatic Variant“ arba „Germline Variant“.
- 2 Įveskite vykdymo pavadinimą, pagal kurį vykdymas bus identifikuojamas nuo sekos nustatymo iki analizės.
- 3 Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, pabraukimo brūkšnius ar brūkšnelius.
- 4 [Pasirinktinai] Įveskite vykdymo aprašą, padedantį identifikuoti vykdymą. Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, pabraukimo brūkšnius ar brūkšnelius.

Vykdyimo deklaracijos failų importavimas

- 1 Patikrinkite, ar deklaracijos, kurias norite importuoti, prieinamos pasiekiamoje prie prietaiso prijungtoje tinklo vietoje arba USB atmintuke.
- 2 Pasirinkite **Import Manifests** (importuoti deklaracijas).
- 3 Raskite deklaracijos failą ir pasirinkite deklaracijas, kurias norite įtraukti.

Mėginių priskyrimas vykdymui

Nurodykite vykdymo mėginius, naudodami tolesnes parinktis.


Enter samples manually (įvesti mėginius neautomatiškai) – naudokite tuščią lentelę ekrane „Create Run“ (kurti vykdymą).

Import samples (importuoti mėginius) – suraskite išorinį formato failą. Ekrane „Create Run“ (kurti vykdymą) galima atsisiųsti šabloną.


Užpildę mėginių lentelę, mėginių informaciją galite eksportuoti į išorinį failą ir jį naudoti kaip atskaitą ruošdami bibliotekas arba importuoti failą kitam vykdymui.

Neautomatinis mėginių įvedimas

- 1 Išskleidžiamajame sąrašė pasirinkite mėginių skaičių ir indeksų rinkinį.
- 2 Įveskite unikalų mėginio pavadinimą („Somatic Variant“ analizės modulis) arba mėginio ID („Germline Variant“ analizės modulis). Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba pabraukimo brūkšnius. „Somatic Variant“ modulyje į vieną mėginio šulinėlį įvestu mėginio pavadinimu automatiškai užpildomas atitinkamas kito telkinio šulinėlis.
- 3 [Pasirinktinai] Naudodami teigiamus ar neigiamus kontrolinius mėginius, spustelėkite dešinįjį pelės klavišą ir pasirinkite kontrolinės medžiagos tipą. „Somatic Variant“ modulyje į vieną mėginio šulinėlį įvestu kontrolinių medžiagų rinkiniu automatiškai užpildomas atitinkamas kito telkinio šulinėlis su ta pačia kontroline medžiaga.
- 4 [Pasirinktinai] Pasirinkite kortelę „Description“ (aprašas) ir įveskite mėginio aprašą. Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba pabraukimo brūkšnius. „Somatic Variant“ modulyje įvestu vieno mėginio šulinėlio aprašu automatiškai užpildomas atitinkamas kito telkinio šulinėlis.
- 5 Išskleidžiamajame sąrašė pasirinkite kortelę **Index 1 (i7)** (1-asis indeksas, i7) ir pasirinkite 1-ojo indekso adapterį.
- 6 Išskleidžiamajame sąrašė pasirinkite kortelę **Index 1 (i5)** (1-asis indeksas, i5) ir pasirinkite 2-ojo indekso adapterį.

- 7 Išskleidžiamajame sąrašė „Manifest“ (deklaracija) pasirinkite deklaracijos failą. „Somatic Variant“ modulio „Pool A“ (A telkinys) esantiems mėginiams reikalingas kitas deklaracijos failas, nei naudojamas „Pool B“ (B telkinys) mėginiams.
- 8 Pasirinkite atitinkamą parinktį, jei norite peržiūrėti, išspausdinti ar išsaugoti plokštelės išdėstymą, kad juo būtų galima remtis rengiant bibliotekas.
 - Norėdami pamatyti plokštelės išdėstymą, pasirinkite piktogramą  **Print** (spausdinti). Pasirinkite **Print** (spausdinti), kad išspausdintumėte plokštelės išdėstymą.
 - Pasirinkite **Export** (eksportuoti), kad eksportuotumėte mėginio informaciją į išorinį failą.
- 9 Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti vykdymą).

Mėginių importavimas

- 1 Spustelėkite **Import Samples** (importuoti mėginius) ir eikite į mėginio informacijos failo vietą. Galima importuoti dviejų rūšių failus.
 - Ekrane „Create Run“ (kurti vykdymą) pasirinkite **Template** (šablonas), kad sukurtumėte naują plokštelės šabloną. Šablono faile pateikiamos tinkamos importuotinos stulpelių antraštės. Kiekviename stulpelyje įveskite vykdymo mėginių informaciją. Ištrinkite informaciją nenaudojamuose langeliuose ir išsaugokite failą.
 - Naudokite mėginio informacijos failą, kuris buvo eksportuotas iš analizės modulio, naudodami funkciją „Export“ (eksportuoti).
- 2 Norėdami pamatyti plokštelės išdėstymą, spustelėkite piktogramą  **Print** (spausdinti).
- 3 Pasirinkite **Print** (spausdinti), kad išspausdintumėte plokštelės išdėstymą, kuris bus naudojamas ruošiant bibliotekas.
- 4 Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti vykdymą).

Reagentų kasetės paruošimas

Tolėsnėmis instrukcijomis aprašoma, kaip atšildyti reagentus naudojant kambario temperatūros vandens vonelę.

- 1 Išimkite reagentų kasetę iš saugyklos, kurioje palaikoma nuo –15 iki –25 °C temperatūra.
- 2 Reagentų kasetę įdėkite į vandens vonelę, kurioje yra pakankamai kambario temperatūros dejonizuoto vandens, kad reagentų kasetės pagrindą būtų galima panardinti iki vandens linijos, atspausdintos ant reagentų kasetės. Neleiskite, kad vanduo pakiltų aukščiau maksimalios vandens linijos.

1 pav. Maksimali vandens linija



- 3 Leiskite reagentų kasetei atšilti kambario temperatūros vandens vonelėje maždaug 60–90 minučių arba tol, kol visiškai atšils.
- 4 Išimkite kasetę iš vandens vonelės ir švelniai pabaksnokite ant stalo, kad pašalintumėte vandenį nuo kasetės pagrindo. Kasetės pagrindą nusauskinkite. Įsitikinkite, kad vandens neužtiško ant reagentų kasetės viršaus.

Reagentų kasetės patikra

- 1 Dešimt kartų apverskite reagentų kasetę, kad sumaišytumėte atšildytus reagentus, tada patikrinkite, ar visos padėtytys yra atšildytos.

PASTABA

Siekiant užtikrinti tinkamą sekos nustatymą, labai svarbu, kad kasetėje esantys reagentai būtų visiškai atšildyti ir sumaišyti.

- 2 Patikrinkite 1, 2 ir 4 padėtyse esančius reagentus ir įsitikinkite, kad jie yra visiškai sumaišyti bei kad juose nėra nuosėdų.

- 3 Švelniai pabaksnokite kasetę ant stalo, kad reagentuose sumažėtų oro burbuliukų.

PASTABA

„MiSeqDx“ siurbtukų vamzdeliai nuleidžiami į kiekvieno rezervuaro apačią, kad įsiurbtų reagentų, todėl svarbu, kad rezervaruose nebūtų oro burbuliukų.

- 4 Iki tol, kai būsite pasiruošę nustatyti vykdymą, reagentų kasetę padėkite ant ledo arba 2–8 °C temperatūroje (iki 6 val.). Norėdami pasiekti geriausių rezultatų, toliau tiesiogiai įdėkite mėginį ir nustatykite vykdymą.

Mėginių paruošimas sekai nustatyti

Nurodymus, kaip mėginio bibliotekas paruošti sekos nustatymui, įskaitant bibliotekos skiedimą ir telkimą, žr. bibliotekos paruošimo pakuotės lapelio dalyje „Naudojimo instrukcijos“.

Mėginio bibliotekų skiedimas priklauso nuo oligonukleotidų telkinių kompleksškumo. „MiSeqDx“ prietaise reikia optimizuoti sankaujų tankį, o optimalus sankaujų tankis skiriasi ir priklauso nuo konkretaus bibliotekų paruošimo tyrimo.

Mėginių bibliotekų įdėjimas į kasetę

Kai reagentų kasetė yra visiškai atšildyta ir paruošta naudoti, esate pasiruošę į kasetę dėti mėginius.

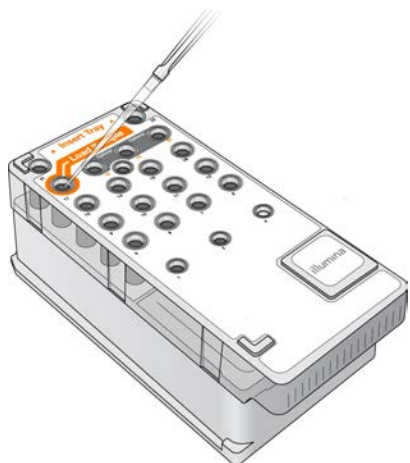
- 1 Naudodami atskirą, švirią ir tuščią 1 ml pipetę, pradurkite folijos plėvelę, dengiančią reagentų kasetės, pažymėtos **Load Samples** (įdėti mėginius), rezervuarą.

PASTABA

Nepradurkite jokių kitų reagentų padėčių. Kitos reagentų padėtyms praduriamos automatiškai vykdymo metu

- 2 Pipete įlašinkite 600 µl **DAL** mėginių bibliotekų į rezervuarą **Load Samples** (įdėti mėginius). Stenkitės neliesti folijos plėvelės.
- 3 Įdėję mėginį patikrinkite, ar rezervuare nėra oro burbuliukų. Jei burbuliukų yra, kasetę švelniai pabaksnokite ant stalo, kad burbuliukus pašalintumėte.

2 pav. Bibliotekų įdėjimas



- 4 Pereikite tiesiai prie vykdymo nustatymo veiksmų, naudodami „MiSeq“ operacinės programinės įrangos (MOS) sąsają.

Vykdymo nustatymas

Visas vykdymo nustatymo instrukcijas rasite „MiSeqDx“ prietaiso informaciniame vadove, skirtame 2 v. MOS sistemai (dokumento Nr. 100000021961).

- 1 Prisijunkite prie „MiSeqDx“ naudodami savo „Local Run Manager“ programinės įrangos slaptažodį.
- 2 Pagrindiniame MOS programinės įrangos ekrane pasirinkite **Sequence** (seka).

- 3 Sąrašė pasirinkite vykdymą, tada – **Next** (pirmyn).
Tolesne tvarka atveriami vykdymo nustatymo ekranai: „Load Flow Cell“ (pratekamosios kiuvetės įdėjimas), „Load Reagents“ (reagentų įdėjimas), „Review“ (peržiūra) ir „Pre-run Check“ (patikra prieš vykdymą).
- 4 Pasirodžius ekranui „Load Flow Cell“ (pratekamosios kiuvetės įdėjimas), išvalykite ir įdėkite pratekamąją kiuvetę.
- 5 Užspauskite pratekamosios kiuvetės skląstį ir uždarykite pratekamosios kiuvetės skyriaus dureles.
Prieš pradėdant vykdymą, skląstis turi būti užspaustas, o skyriaus durelės – uždarytos. Įdėjus pratekamąją kiuvetę, programinė įranga nuskaity ir įrašo RFID. Apatiniame dešiniajame ekrano kampe pasirodo patvirtinimas, kad RFID buvo sėkmingai nuskaitytas.
- 6 Vadovaudamiesi programinės įrangos raginimais, įdėkite „MiSeqDx“ SBS tirpalo (PR2) buteliuką, įsitikinkite, kad atliekų butelis tuščias, ir įdėkite reagentų kasetę.
Įdėjus „MiSeqDx“ SBS tirpalo (PR2) buteliuką ir reagentų kasetę, programinė įranga nuskaity bei įrašo RFID. Apatiniame dešiniajame ekrano kampe pasirodo patvirtinimas, kad RFID buvo sėkmingai nuskaitytas.
- 7 Prasidėjus vykdymui atveriamas ekranas „Sequencing“ (sekos nustatymas). Šiame ekrane vaizdiškai pateikiamas dabartinis vykdymas, įskaitant intensyvumą ir kokybės įverčius.

Rezultatai

Integruotoji analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai kiekvieno sekos nustatymo ciklo bazei priskiria kokybės įvertį. Pasibaigus pirminei analizei, „MiSeqDx“ prietaiso modulis, *Vykdymo kūrimas naudojant „Local Run Manager“* 6 psl. (vykdymo kūrimas naudojant „Local Run Manager“), pradeda antrinę analizę, kaip aprašyta čia.

Išskirstymas

Išskirstymo funkcija kiekvieną indeksų nuskaitymo seką palygina su vykdymui priskirtomis indeksų sekomis. Atliekant šį veiksmą neatsižvelgiama į jokias kokybės vertes.

Indeksų nuskaitymai identifikuojami atliekant toliau nurodytus veiksmus.

- Mėginiai sunumeruojami pradėdant nuo 1 tokia tvarka, kokia jie išdėstyti vykdymui skirtame sąrašė.
- Mėginys, kurio numeris yra 0, rezervuojamas spiečiams, kurie nebuvo priskirti mėginiui.
- Spiečiai mėginiui priskiriami, kai visiškai sutampa indeksų seka arba kai yra ne daugiau nei viena indeksų nuskaitymo neatitiktis.

FASTQ failų generavimas

Atlikus išskirstymą programinė įranga sugeneruoja tarpinės analizės failus FASTQ formatu (tekstiniu formatu, naudojamu sekoms apibūdinti). FASTQ failai apima kiekvieno mėginio nuskaitymus ir susijusius kokybės įverčius. Vykdyme naudojamos kontrolinės medžiagos ir filtro nepraėjusios sanaupos neįtraukiamos.

Kiekviename FASTQ faile yra tik vieno mėginio nuskaitymai. To mėginio pavadinimas yra įtrauktas į FASTQ failo pavadinimą. „Somatic Variant“ darbo eigoje vienam mėginiui generuojami keturi FASTQ failai (po 2 kiekvienam oligonukleotidų telkiniui) – du iš 1-ojo nuskaitymo ir du iš 2-ojo nuskaitymo. FASTQ failai yra pagrindinė įvestis lygiuojant.

Prilygiavimas

Prilygiavimo metu juostinis Smitho-Watermano algoritmas sulygiuoja kiekvieno mėginio sanaupas pagal amplikonų sekas, nurodytas deklaracijos faile.

Juostinis Smitho-Watermano algoritmas atlieka pusiau visuotinę sekos prilygiavimą, kad aptiktų panašias sritis tarp dviejų sekų. Užuoat lyginęs visą seką, Smitho-Watermano algoritmas lygina visų galimų ilgių segmentus.

Kiekvienas pagal galą suporuotas nuskaitymas įvertinamas pagal jo prilygiavimą su atitinkamomis to nuskaitymo zondo sekomis.

- „Read 1“ (1 nuskaitymas) įvertinamas pagal pasrovinių konkretaus lokuso oligonukleotidų (angl. „Downstream Locus-Specific Oligo“, DLSO) atvirkštinį komplementą.

- „Read 2“ (2 nuskaitymas) įvertinamas pagal priešrovininius konkretaus lokuso oligonukleotidus (angl. „Upstream Locus-Specific Oligo“, ULSO).
- Jei nuskaitymo pradžia sutampa su zondo seka (ne daugiau kaip trys skirtumai, t. y. nesutapimai arba poslinkiai dėl priekinių sekų intarpų / iškritų), visas nuskaitymo ilgis lygiuojamas pagal tos sekos tikslinį amplikoną.
- Dėl tyrimo cheminių savybių DLSO ir ULSO esantys intarpai / iškritos nestebimi.

Prilygiavimo rezultatai įrašomi prilygiavimo failuose (BAM failuose). Nuskaitymai išfiltruojami iš prilygiavimo rezultatų, remiantis neatitiktis rodikliu arba dominančioje srityje, arba visame amplikone, atsižvelgiant į amplikono ilgį. Filtruoti nuskaitymai įrašomi prilygiavimo failuose, tačiau pažymimi kaip nesulygiuoti ir jie nenaudojami priskiriant variantus.

Variantų priskyrimas

Variantų priskyrimo priemonė („Pisces“) priskiria SNV, MNV ir intarpų / iškritų variantus iš prietaisui paruoštų bibliotekų.

Ataskaitos ir papildomi išvesties failai

Variantų analizės moduliai sukuria PDF ir tabuliacijos žymėmis atskirto teksto (*.txt) ataskaitas, kuriose rodoma įvairi metrika, pvz., sekos nustatymo aprėpties gylys ir variantų skaičius. Šie moduliai taip pat sukuria įvairius išvesties failus, pvz., VCF ir genomo variantų priskyrimo formato (gVCF) failus.

Kokybės kontrolės procedūros

„MiSeqDx“ programinė įranga kiekvieną vykdymą, mėginio ir bazės priskyrimą įvertina pagal kokybės kontrolės metriką. Taip pat reikia įvertinti teigiamas ir neigiamas kontrolines medžiagas, naudojamas ruošiant bibliotekas. Sekos nustatymo kontrolinių medžiagų rezultatai įvertinami toliau nurodytu būdu.

- Jei, naudojant bešablone kontrolinę medžiagą, priskyrimo dažnis buvo didesnis nei 10 %, galėjo įvykti mėginių stebėjimo klaida, galėjo būti neteisingai įrašyti indeksavimo pradmenys arba galėjo būti užteršta bešablone kontrolinė medžiaga. Protokolas laikomas nepavykusiu ir jį visą reikia pakartoti, pradedant nuo bibliotekų paruošimo.
- Teigiamas kontrolinis mėginys turi generuoti numatomą rezultatą. Jei, naudojant teigiamą kontrolinę medžiagą, sugeneruojamas rezultatas, kuris skiriasi nuo numatomo, galėjo įvykti mėginių stebėjimo klaida arba galėjo būti neteisingai įrašyti indeksavimo pradmenys. Visą protokolą reikia pakartoti, pradedant nuo bibliotekų paruošimo.

Veikimo charakteristikos

Atliekant „Germline“ tyrimus, bibliotekoms paruošti buvo naudojamas „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimas arba „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ reagentai. Šiuose dviejuose rinkiniuose naudojami tokie patys bibliotekų paruošimo reagentai, o jų darbo eigos skiriasi tik vienu aspektu: polimerazės grandininės reakcijos (PGR) ciklų skaičiumi (atitinkamai 25 ir 28). Papildomi PGR ciklai suteikia galimybę naudoti mažesnę DNR įvestį su „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ (50 ng), palyginti su „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimu (250 ng), kaip parodyta DNR įvesties tyrime naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“. Bibliotekų, paruoštų naudojant „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimą, sekos nustatymas buvo atliktas naudojant rinkinyje pridėtus sekos nustatymo reagentus. Bibliotekų, paruoštų naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“, sekos nustatymas buvo atliktas naudojant „MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinį. Pastarųjų sekos nustatymo reagentų išvestis yra didesnė nei „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimo reagentų.

Atliekant somatinių variantų tyrimus, buvo naudojami „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir „MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinys.

Visi tyrimai buvo atlikti „MiSeqDx“ prietaisu. Buvo vadovaujamosi gonocitų linijos arba somatinių variantų darbo eigomis, kuriose aprašyta, kaip, naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“, bibliotekas paruošti sekai nustatyti, ir atlikta analizė atitinkamai naudojant „Germline Variant“ modulį arba „Somatic Variant“ modulį, išskyrus du atvejus. Atliekant tyrimus, kuriuose kaip reprezentatyvios mutacijų grupės buvo naudojamas vienas genas („Germline“ veikimo charakteristikos; „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimas) arba du genai

(„Somatic“ veikimo charakteristikos), buvo naudojamos konkrečioms tyrimams skirtos darbo eigos ir analizės moduliai.

Pastaba. Amplikonų genomo turinys apibendrintas palyginti su nuskaitytos sekos genomo gija. Amplikonų, sukurtų pagal minusinę giją, referentinio genomo turinys yra atvirkštinis komplementas (pavyzdžiui, PolyA sritys minusinės gijos amplikonuose atitinka PolyT sritis referentiniame genome).

Skaičiavimų, naudojamų veikimo charakteristikose, apibrėžtys

- 1 Teigiama procentinė atitiktis (PPA) apskaičiuojama kaip lokusų, kurie referentiniu metodu klasifikuojami kaip variantai, dalis, tiksliai pateikiama tyrime.
 - (variantų lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) / (bendrasis variantų padėčių sk.)
 Tyrime pateikiami variantų lokusai, atitinkantys referentinio metodo reikalavimus, yra teisingi teigiamieji (TP). Variantų lokusai, tyrime pateikiami kaip referencijos priskyrimai arba skirtingi variantų priskyrimai, yra klaidingi neigiamieji (FN)
- 2 Neigiama procentinė atitiktis (NPA) apskaičiuojama kaip lokusų, kurie referentiniu metodu klasifikuojami kaip nemutantinio tipo, dalis, tiksliai pateikiama tyrime.
 - (Nemutantinio tipo lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) / (bendrasis nemutantinio tipo lokusų sk.)
 Tyrime pateikiami nemutantinio tipo lokusai, atitinkantys referentinio metodo reikalavimus, yra teisingi neigiamieji (TN). Nemutantinio tipo lokusai, tyrime pateikiami kaip variantai, yra klaidingi teigiamieji (FP).
- 3 Bendroji procentinė atitiktis (OPA) apskaičiuojama kaip lokusų, kurie tiksliai pateikiamos tyrime, dalis referentinio metodo atžvilgiu.
 - (variantų lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) + (nemutantinio tipo lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) / (bendrasis variantų lokusų sk.) / (bendrasis nemutantinio tipo lokusų sk.)
- 4 Skaičiuojant PPA, NPA ir OPA, neįtraukiami nepriskyrimai (variantų ar referentiniai lokusai, netenkinantys vieno ar kelių kokybės filtrų sąlygų). Dviejuose tyrimuose nepriskyrimai konkrečiai įtraukti į metriką „Teisingų priskyrimų procentas“, o apie šį įtraukimą pažymima taikomose lentelėse.
- 5 Priskyrimo dažnis apskaičiuojamas bendrąjį filtrų sąlygas tenkinančių lokusų skaičių padalijus iš bendrojo 1–22 chromosomų nuskaitytos sekos padėčių skaičiaus; X ir Y chromosomos neįtraukiamos. Ši metrika neatsižvelgia į priskyrimų atitikimą referentiniam metodui.

Norėdami sužinoti veikimo charakteristikas, susijusias su prieš analizę galiojančiais veiksniais (pvz., išskyrimo metodais ar DNR įvestimi), žr. taikomo bibliotekų paruošimo metodo pakuotės lapelį.

Mėginių indeksavimas

Mėginių indekso pradmenys, pridėti ruošiant bibliotekas, kiekvienai mėginio DNR priskiria unikalį seką, todėl kelis mėginius galima sukaupti į vieną sekos nustatymo vykdymą. Mėginių indeksavimo funkcija naudojama tiek su gonocitų linijos, tiek su somatinių variantų darbo eigomis.

Buvo iširti iš viso 96 mėginių indeksai atliekant reprezentatyvųjį tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti ir apimantį 12 588 kiekvienos gijos bazes visose 23 žmogaus chromosomose, siekiant patikrinti, ar tyrimu galima nuosekliai priskirti konkretaus mėginio genotipus, kai taikomi skirtingi indeksavimo pradmenų deriniai. Y chromosomoje nėra didelio pasikliovimo sričių, todėl ji nebuvo vertinama. Buvo iširti aštuoni unikalūs mėginiai, kiekvienam iš jų taikant 12 skirtingų indeksavimo pradmenų derinių. Mėginių rezultatai, gauti iš „Germline“ analizės modulio, buvo palyginti su „Platinum Genomes“ 2016-01 versija. Kiekvieno iš 96 indeksų derinių PPA (SNV variantai ir intarpai / iškritos) viršijo 97 % (teisingai teigiamų SNV priskyrimų buvo mažiausiai 70, intarpų – 38, iškritų – 36), o NPA buvo 100 % (mažiausiai 23 440 referentinių padėčių kiekviename indeksų derinyje). Atskirai buvo išbandytas vienas indeksas siekiant patvirtinti, kad, naudojant „MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinio sekos nustatymo chemines medžiagas, galima iširti mažiau nei 8 mėginius (naudojant ankstesnes „MiSeqDx“ 1.0 v. universaliojo rinkinio chemines medžiagas, buvo galima tirti mažiausiai 8 mėginius). Vieno indekso SNV PPA vertė buvo 98,9 % (180 / 182), intarpų – 100 % (38 / 38), o iškritų – 100 % (46 / 46). NPA buvo 100 % (23 856 / 23 856).

Buvo iširta dvylika mėginio replikatų (24 bibliotekos), siekiant išmatuoti indeksų tikslumą, naudojant 0,05–0,10 dažnio somatinius variantus ir „Somatic Variant“ modulį (somatiniams priskyrimams atlikti kiekvienam

replikatui naudojami 2 indeksų deriniai). SNV (64 / 64), intarpų (11 / 11) ir iškritų (19 / 19) PPA buvo 100 %. Visų indeksų derinių NPA buvo 100 % (mažiausiai 11 590 referentinių padėčių kiekvienam indeksų deriniui).

Mėginių pernaša

„MiSeqDx“ prietaiso darbo eiga apima bibliotekų paruošimą ir kelių mėginių sekos nustatymą bei vienu metu apdorojamus kontrolinius mėginius. Buvo atliktas mėginių pernašos tyrimas siekiant įvertinti, ar klaidingai teigiami rezultatai, gauti dėl pernašos ir šulinėlių užteršimo ruošiant mėginių bibliotekas bei dėl vykdymų užteršimo tarp vieno po kito vykdymų sekos nustatymų, turi įtakos tyrimų rezultatams. Buvo naudojami somatiniai variantai, nes juos galima aptikti esant mažesnio alelių dažnio įvykiams nei gonocitų linijos variantus. Atliekant reprezentatyvųjį dviejų genų tyrimą, mėginius sudarė keturi genomo DNR mėginiai iš ląstelių linijų (kiekviename iš jų – skirtingos grupės mutacijos). Mėginiai buvo parinkti taip, kad kokioje nors vieno iš jų padėtyje esanti mutacija turėtų referentinę (nemutantinio tipo) seką kituose.

Pernaša iš vieno šulinėlio į kitą apibrėžiama kaip trikties tipas, sukurtas rankomis atliekant apdorojimo veiksmus (pipetavimą, mėginių maišymą ir kt.). Siekiant įvertinti pernašą iš vieno mėginių šulinėlio į kitą, buvo atlikti toliau nurodyti dvi tyrimų vykdymai.

- Šachmatų lentos principu išdėstytas didelės įvesties genomo DNR (gDNR) mėginys, kuriame yra 1 geno mutacija, jį keičiant mažos įvesties gDNR, kurioje yra 2 geno mutacija, mėginiu.
- Šachmatų lentos principu išdėstytas didelės įvesties gDNR mėginys, kuriame yra 2 geno mutacija, jį keičiant mažos įvesties gDNR, kurioje yra 1 geno mutacija, mėginiu.

Atliekant kiekvieną vykdymą buvo įvertinta, ar klaidingų teigiamųjų (pvz., šulinėlyje deklaruota 1 geno mutacija, nurodyta kaip 2 geno mutantinio tipo mėginys, arba atvirkščiai) nėra 12-oje replikatų.

Pernaša iš vieno vykdymo į kitą apibrėžiama kaip trikties tipas, galbūt atsiradęs dėl ankstesnio sekos nustatymo vykdymo nuosėdų. Siekiant nustatyti, ar yra pernaša tarp sekos nustatymo vykdymų, buvo paruoštos dvi plokštelės; kiekvienoje iš jų buvo 11 vieno unikalaus didelės įvesties gDNR mėginio replikatų ir tuščiasis mėginys; taip pat „MiSeqDx“ prietaise buvo atliktas plokštelių sekos nustatymas ir patikrinta, ar jose nėra klaidingų teigiamųjų. Pirmąjį vykdymą sudarė 11 2 geno mutantinio tipo mėginio replikatų ir vienas tuščiasis mėginys. Antrąjį vykdymą sudarė 11 1 geno mutantinio tipo mėginio replikatų ir 1 tuščiasis mėginys. Pirmiausia buvo atliktas 2 geno mutantinio tipo mėginių bibliotekos sekos nustatymas, tada – 1 geno mutantinio tipo mėginių bibliotekos sekos nustatymo vykdymas, tada – dar viena 2 geno mutantinio tipo mėginių bibliotekos sekos nustatymo vykdymas. Jei, atliekant 1 geno tik mutantinio tipo mėginių vykdymą, pastebima bet kokių 2 geno mutacijų, ir atvirkščiai, tai nurodo pernašą.

Nebuvo deklaruota nė vieno klaidingo teigiamojo (0 / 24, 0 %), atsiradusio dėl pernašos iš vieno šulinėlio į kitą. Buvo aptiktos visos numatytos mutacijos. Nebuvo deklaruota nė vieno klaidingo teigiamojo (0 / 24, 0 %), atsiradusio dėl pernašos iš vieno vykdymo į kitą. Buvo aptiktos visos numatytos mutacijos. Nebuvo deklaruota nė vieno klaidingo teigiamojo (0 / 48, 0 %), atsiradusio dėl bendrosios pernašos (iš vieno šulinėlio į kitą ir iš vieno vykdymo į kitą).

„Germline“ veikimo charakteristikos

Čia aprašytuose tyrimuose naudojant „Germline Variant“ modulį buvo analizuojami sekos nustatymo duomenys, išskyrus tuos tyrimus, kuriuose buvo naudojama vieno geno grupė ir konkrečiam tyrimui skirtas modulis.

Tikslumas

Siekiant įvertinti „MiSeqDx“ prietaiso tikslumą, kai naudojamas „MiSeqDx“ 3 v. reagentų rinkinys ir aukštos kokybės DNR, buvo atliktas tolesnis tyrimas. Tyrime buvo naudojamas reprezentatyvusis tyrimas, skirtas įvairiems genams analizuoti, apimantis 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų, naudojant 150 amplikonų. Y chromosomoje nėra didelio pasiklovimo sričių, todėl ji nebuvo vertinama. Šiame tyrime naudoti dvylika unikalių mėginių yra iš vienos šeimos – dviejų tėvų ir 10 vaikų – mėginių sekos nustatymas buvo dažnai atliekamas keliuose laboratorijose ir taikant kelias sekos nustatymo metodologijas. Penki mėginiai yra moterų, o septyni – vyrų. Kiekvienas mėginys buvo tiriamas dviem egzemplioriais. SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas tyrimo duomenis palyginus su išsamiai apibūdinta referentine duomenų baze. Referentinė duomenų bazė („Platinum Genomes“ 2016-01 versija) buvo sukurta sujungus kelias sekos nustatymo metodologijas, viešai prieinamus duomenis ir informaciją apie paveldėjimą. Remiantis šiuo referentiniu metodu buvo apibrėžtos didelio pasiklovimo genomo sritys, nebent nurodyta kitaip. Iš viso buvo atlikti aštuoni mėginių vykdymai; tikslumui parodyti pateiktose lentelėse naudojami pirmojo vykdymo duomenys.

1 lentelėje pateikiami tyrimo duomenys su teigiama ir neigiama procentine atitiktimi kiekvieno mėginio atveju, o variantų rezultatai dėl PPA skaičiavimo palyginami su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu. Trys variantų tipai (SNV, intarpai ir iškritas) sujungiami. Kadangi, taikant referentinį metodą, rezultatai gaunami tik apie vieno nukleotido variantus ir intarpus / iškritas, dėl NPA skaičiavimo ne variantų bazių rezultatai palyginami su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija.

1 lent. „MiSeqDx“ prietaiso kiekvieno mėginio bazių priskyrimo rezultatų atitiktis

Mėginys	Vidutinis priskyrimo dažnis	Iš viso variantų	Iš viso TP variantų	Iš viso FN variantų	Iš viso nepriškimų	Iš viso TN priskyrimų	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

Reprezentatyvų tyrimą sudarė 150 amplikonų, skirtų įvairiam genomo turiniui apimti. Amplikonų GC turinio intervalas – 26–87 %. Be amplikonų, taip pat pasitaikė įvairių vienkartinų pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (2 lent.) siekiant nustatyti genomo turinio poveikį teisingų priskyrimų procentui. Teisingų priskyrimų procentą sudaro variantų ir referencijos priskyrimai; jei yra neteisingų priskyrimų arba kažkas nepriskiriama, šis procentas yra mažesnis už 100 %. Kai, priskiriant variantus, neįvykdomos vieno ar kelių filtrų sąlygos (pvz., nepakankama aprėptis), niekas nepriskiriama.

Iš aštuonių 2 lent. pateiktų FN variantų septyniuose į 111 amplikoną, kurio sudėtyje taip pat yra PolyA homopolimeras ir kurio GC turinys – 0,29, įterpta 1 bp. Likęs 1 FN (neteisingas priskyrimas) atsirado dėl numatyto heterozigotinio SNV 125 amplikone, kurio GC turinys – 0,68, vadinamame homozigotiniu variantu. SNV variantų dažnis buvo 0,71, kuris yra didesnis nei 0,70 – klasifikavimo homozigotiniais variantais slenkstinė vertė. Amplikonas, kurio teisingų priskyrimų procentas buvo mažiausias (98,2 %), buvo 17-asis – 40 nepriskyrimo atvejų, AT pakartojimai ir 27 % GC turinys.

2 lent. „MiSeqDx“ prietaiso amplikonų lygio tikslumas

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiqliovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Iš viso teisingų priskyrimų	Iš viso neteisingų priskyrimų	Iš viso nepriskyrimų	Teisingų priskyrimų proc.
1	1	36450499	36450591	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), intarpas / iškrita	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	1680	0	0	100

7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), intarpas / iškrita	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), intarpas / iškrita	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Netaikoma	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Netaikoma	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Netaikoma	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	Netaikoma	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), intarpas / iškrita	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), intarpas / iškrita	0,71	2184	0	0	100

49	7	154404519	154404599	81	66	Netaikoma	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Netaikoma	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,35	2280	0	0	100

64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Netaikoma	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Netaikoma	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Netaikoma	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Netaikoma	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Netaikoma	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	Netaikoma	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	Intarpas / iškrita	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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	Netaikoma	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), intarpas / iškrita	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,25	1632	0	0	100

96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Netaikoma	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita (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), intarpas / iškrita	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Netaikoma	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Netaikoma	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Netaikoma	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Netaikoma	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Netaikoma	0,68	2328	0	0	100

142	22	37409844	37409940	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Netaikoma	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	Netaikoma
149	Y	2655519	2655609	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	Netaikoma
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Netaikoma

Nepriskirtų variantų suvestinė pateikta 3 lent.. Lentelėje išvardyti konkretūs filtrai, kuriuos naudojant nieko nepriskirta. Intarpas 111 amplikone buvo filtruotas 9-iuose iš 16 atvejų, o likę septyni atvejai buvo priskirti kaip referencijos, todėl jie yra FN.

3 lent. Variantų nepriskyrimų suvestinė

Amplikono nr.	Chr.:pad.	Variantas	Atitinkamo amplikono turinys	Filtrai	Praleisti variantai	Numatomi variantai	FN priskyrimai
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: kartotinis filtras. Variantas filtruojamas, jei visas variantas ar jo dalis pakartotinai matomi referentiniame genome šalia varianto padėties. Reikia, kad referencijoje būtų bent 9 pakartojimai, o atsižvelgiama tik į tuos pakartojimus, kurių ilgis yra iki 5 bp.

Mėginio NA12878 sekos nustatymo rezultatai buvo palyginti su didelio pasikliovimo lygio NA12878 genotipu, kurį nustatė Nacionaliniai standartų ir technologijų institutai (NIST) (2.19 v.). Iš 150 amplikonų 92 amplikonai buvo didelio pasikliovimo lygio genomo sričių ribose, 41 amplikonas su NIST seka persidengė iš dalies, o 17 amplikonų visiškai nepersidengė. Palyginimui buvo gauta 10 000 vieno replikato koordinacijų. Ne variantų bazių priskyrimai buvo palyginti su žmogaus genomo referentinės sekos 19 versija. Tikslumo rezultatai parodyti 4 lentelėje.

4 lent. „MiSeqDx“ prietaiso mėginio NA12878 bazių priskyrimo atitikties NIST duomenų bazei rezultatai

Mėginys	Amplikonų sk.	Vidutinis priskyrimo dažnis	Iš viso TP variantų	Iš viso FN variantų	Iš viso TN priskyrimų	Iš viso FP priskyrimų	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Buvo atlikta papildoma mėginių analizė, susijusi su mažų intarpų ir iškritų (intarpų / iškritų) priskyrimu (5 lent.). Kai kuriais atvejais intarpas / iškrita dažnai pasitaikė tarp dviejų ar daugiau mėginių, kaip matyti stulpelyje „Iš viso mėginių replikatų su intarpu / iškrita“. 12 galiojančių mėginių abiejų replikatų rezultatai pateikti 5 lent. Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp. Kiekvienas iš 69 intarpų / iškritų buvo aptikti su teigiama procentine 100 proc. atitiktimi. Viena iškrita (64 amplikonas; 2 bp iškrita (chr10 55892600 TAC>T) teisingų priskyrimų neturėjo, nes kiekvienas iš šių variantų nebuvo priskirtas dėl R5x9 filtro5); todėl PPA, į kurią priskyrimai neįtraukti, apskaičiuoti nepavyko. Dar vienas intarpas / iškrita, 1 bp intarpas (chr17 39589692 C>CA 111 amplikone) taip pat neturėjo teisingų priskyrimų, nes 9 variantai nebuvo priskirti dėl R5x9 filtro, o 7 buvo FN priskyrimai.

5 lent. Intarpų / iškritų aptikimo „MiSeqDx“ prietaisu suvestinė

Amplikonas	Chromosoma	Padėtis	Analizuoto fragmento dydis	Amplikono intarpo / iškritos tipas ir ilgis	Intarpas / iškrita	Iš viso mėginių replikatų su intarpu / iškrita	Nepriškyrimų sk.	Iš viso neteisingų intarpo / iškritos priskyrimų	Iš viso teisingų intarpo / iškritos priskyrimų	PPA
1	1	36450544	93	25 bp iškrita	GAAAATTTA ATGAAACACA TTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp iškrita	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 bp intarpas	T>TTTTAAT AGCAAAAAG AGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 bp iškrita	GACAGACTGTG AGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 bp intarpas	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 bp intarpas	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	7 bp intarpas	T>TTTGTTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 bp iškrita	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 bp intarpas	T>TTAAAA	24	0	0	24	100

14	2	212245090	91	12 bp intarpas	C>CTGAAAATAGGA T	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 bp intarpas	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 bp iškrita	TAACCTAAA ATTACAAAAT AACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 bp intarpas	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 bp iškrita	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 bp iškrita	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 bp intarpas	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 bp iškrita	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 bp intarpas	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 bp iškrita	CCCTGGGTG CTATAGCC CACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 bp iškrita	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 bp iškrita	CTTTCACTT TCCCGTCTCA TGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 bp iškrita	GGCATGAGG CTTGGTGACA TGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 bp intarpas	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 bp iškrita	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 bp intarpas	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 bp iškrita	GGATA>G	8	0	0	8	100

50	7	156476548	93	11 bp iškrita	GAATCTG CACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 bp iškrita	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 bp intarpas	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 bp intarpas	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 bp iškrita	TCTGGGGG GCAGCCCCT GAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 bp iškrita	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 bp iškrita	AGCGTCTATA ACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 bp iškrita	TAC>T	10	10	0	0	Netaikoma
68	11	30177690	70	2 bp intarpas	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 bp intarpas	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 bp iškrita	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 bp iškrita	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 bp intarpas	T>TTCTCAGT ACGGTGAACC CCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 bp intarpas	C>CAAAATAT AAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 bp intarpas	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 bp iškrita	ATCTATTTTCT AATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 bp iškrita	TTTAAAATT TGAATGTGAT AAAA>T	24	0	0	24	100

90	14	58050081	81	4 bp intarpas	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 bp iškrita	CTTGCTCTA TAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 bp iškrita	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 bp iškrita	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 bp iškrita	GCCCTGAGC CAGCTCCCG CTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 bp intarpas	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 bp intarpas	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 bp iškrita	ATTATTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 bp iškrita	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 bp intarpas	A>ATCCTATTC TACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 bp intarpas	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 bp intarpas	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 bp intarpas	T>TTCTGAAG GTCAAGTCTA TCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 bp iškrita	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 bp iškrita	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 bp intarpas	T>TGTATCTTAG CAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 bp intarpas	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 bp iškrita	ACT>A	20	0	0	20	100

130	20	21766863	70	15 bp iškrita	TACTTGAGAA CTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	5 bp intarpas	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 bp intarpas	G>GGAAT GTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 bp iškrita	TCCTGGCTGG CCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 bp intarpas	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 bp iškrita	ACTCAAGAT AACTCATGTT ATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp iškrita	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 bp intarpas	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 bp intarpas	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 bp iškrita	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Atkuriamumas

Buvo atlikti du tyrimai, siekiant įvertinti „MiSeqDx“ prietaiso tikslumą, kai jis naudojamas su ląstelių linijomis (1-asis ir 2-asis tyrimai) arba su mažai leukocitų turinčiu krauju, į kurį įmaišyta ląstelių linijų (2-asis tyrimas). 1-ajame tyrime buvo naudojami keli prietaisai; antrajame tyrime – kelios tyrimų vietos.

1 tyrimas

„MiSeqDx“ prietaiso atkuriamumas buvo nustatytas naudojant du prietaisus, du operatorius ir dvi reagentų partijas (iš viso atlikti aštuoni vykdymai). Reprezentatyvusis tyrimas, mėginiai ir referentinis metodas yra tokie patys, kaip aprašyta tikslumo tyrimo atveju.

Pateikiami kiekvieno prietaiso kiekvieno amplikono rezultatai (6 lent.), siekiant parodyti priskyrimo atkuriamumą visuose prietaisuose. Į teisingų priskyrimų procentą įtraukti ir neteisingi priskyrimai, ir nepriskyrimai (neįvykdytos vieno ar kelių variantų priskyrimo filtrų sąlygos). Prietaisai generavo panašų nepriskyrimų ir neteisingų priskyrimų skaičių, priklausantį nuo konkretaus amplikono.

6 lent. Skirtingų „MiSeqDx“ prietaisų atkuriamumo tyrimo rezultatai (amplikonų lygis)

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analiizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų genomotūrinys	GC turinys	1-asis „MiSeqDx“			2-asis „MiSeqDx“		
								Iš viso teisingų priskyrimų	Iš viso neteisingų priskyrimų	Iš viso nepriskyrimų	Iš viso teisingų priskyrimų	Iš viso neteisingų priskyrimų	Iš viso nepriskyrimų
1	1	36450499	36450591	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), intarpas / iškrita	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), intarpas / iškrita	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	7680	0	0	7680	0	0

10	2	177016721	177016805	85	81	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), intarpas / iškrita	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Netaikoma	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Netaikoma	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Netaikoma	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	Netaikoma	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	8832	0	0	8832	0	0

37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), intarpas / iškrita	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), intarpas / iškrita	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Netaikoma	0,31	6336	0	0	6336	0	0

50	7	156476507	156476599	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Netaikoma	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,35	9120	0	0	9120	0	0

64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Netaikoma	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Netaikoma	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Netaikoma	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Netaikoma	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Netaikoma	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	Netaikoma	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	Intarpas / iškrita	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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	Netaikoma	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), intarpas / iškrita	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Netaikoma	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita (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), intarpas / iškrita	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Netaikoma	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Netaikoma	0,59	9504	0	0	9504	0	0

125	19	18121418	18121491	74	74	Netaikoma	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Netaikoma	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Netaikoma	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Netaikoma	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Atkuriamumo tyrimo rezultatai buvo analizuojami kiekvieno operatoriaus atžvilgiu, naudojant variantų dažnį (7 lent.). Šia analize parodyta, kad visų operatorių variantų dažniai buvo nuoseklūs. Pateikiami vidutiniai variantų dažniai \pm 1 standartinis nuokrypis.

7 lent. „MiSeqDx“ prietaiso skirtingų operatorių rezultatai

Variantų dažnių diapazonas	Unikalių variantų sk.	Iš viso išanalizuotų 1 operatoriaus variantų	Iš viso išanalizuotų 2 operatoriaus variantų	1 operatoriaus vidutinis (SD) deklaruotas variantų dažnis	2 operatoriaus vidutinis (SD) deklaruotas variantų dažnis
Homozigotiniai (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 \pm 0,07	0,96 \pm 0,05
Heterozigotiniai (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04

Kiekvieno mėginio atkuriamumo tyrimo rezultatai rodomi sujungti iš visų aštuonių vykdymų (8 lent.). Kiekvieno varianto tipo – SNV, intarpų ir iškritų – aptikimas įvertinamas atskirai. Referentinės padėtyš neįtraukiamos. Šia analize parodyta, kad variantų rezultatai atkuriami pasirinkus visus mėginius.

8 lent. „MiSeqDx“ prietaiso kiekvieno mėginio bazių priskyrimo rezultatų atitiktis

Mėginys	SNV				Intarpai				Iškritos			
	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

8-iais šio atkuriamumo tyrimo vykdymais gauti duomenys pagrindžia teiginį, kad „MiSeqDx“ prietaisas gali nuosekliai atlikti sekos nustatymą toliau nurodytais atvejais.

- GC turinys \geq 19 % (visos priskirtos bazės 192 iš 192 nuskaitytos sekos ampliconuose: 19 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 1,1 %)
- GC turinys \leq 78 % (visos priskirtos bazės 192 iš 192 nuskaitytos sekos ampliconuose: 78 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimų nebuvo)
- PolyA ilgis \leq 8 (8 nukleotidų PolyA pakartojimas buvo teisingai priskirtas 192 iš 192 nuskaitytos sekos ampliconų, kurių sudėtyje buvo PolyA = 8)

- PolyT ilgis ≤ 10 (10 nukleotidų PolyT pakartojimas buvo teisingai priskirtas 192 iš 192 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyT = 10)
- PolyG ilgis ≤ 7 (7 nukleotidų PolyG pakartojimas buvo teisingai priskirtas 192 iš 192 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyG = 7)
- PolyC ilgis ≤ 6 (6 nukleotidų PolyC pakartojimas buvo teisingai priskirtas 576 iš 576 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyC = 6)
- Pasikartojančių dinukleotidų ilgis $\leq 11x$ (visos priskirtos bazės 192 iš 192 nuskaitytos sekos amplikonų su 11x pasikartojančių dinukleotidų buvo priskirtos tinkamai, o nepriskyrimo dažnis – 0,5 %)
- Pasikartojančių trinukleotidų ilgis $\leq 5x$ (visos priskirtos bazės 192 iš 192 nuskaitytos sekos amplikonų su 5x pasikartojančių trinukleotidų buvo priskirtos tinkamai, o nepriskyrimo dažnis – 0,5 %)
- 24 arba mažiau bazių intarpų ir 25 arba mažiau bazių iškritų
 - 24 bazių intarpai teisingai priskirti 192 iš 192 mėginių
 - 25 bazių iškritos teisingai priskirtos 223 mėginiuose, o netinkamai priskirtos 1 mėginyje iš 224 mėginių

2 tyrimas

Atkuriamumo skirtingose tyrimų vietose tyrimas, atliktas naudojant reprezentatyvų tyrimą – „Illumina MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimą – apėmė *CFTR* klinikinį požiūrį reikšmingų genetinių variacijų, išanalizuotų „MiSeq“ ataskaitų priemonės programine įranga naudojant „MiSeqDx“ tikslią DNR sekos nustatymo darbo eigą, pogrupį (9 lent.). Šiame aklame tyrime buvo naudojamos 3 bandomosios tyrimų vietos, o kiekvienoje iš jų – 2 operatoriai. Kiekvienas operatorius kiekvienoje tyrimų vietoje ištyrė dvi išsamiai apibūdintas grupes, kurių kiekvieną sudarė 46 mėginiai: kiekvienoje tyrimų vietoje iš viso atlikta 810 priskyrimų. Grupės sudarė genomo DNR iš ląstelių linijų su žinomais *CFTR* geno variantais bei mažai leukocitų turinčio kraujo, į kurį įmaišyta ląstelių linijų su žinomais *CFTR* geno variantais, mišinys. Kraujo mėginiai buvo pateikti, kad būtų galima įtraukti išskyrimo veiksmus, kuriais paruošiama gDNR – pirminė tyrimo darbo eigos įvestis. Sėkmingai ištirtų mėginių procentas, apibrėžiamas kaip mėginių, pirmuoju bandymu praėjusių KK metriką, skaičius, buvo 99,88 %. Visi tyrimų rezultatai grindžiami pradiniais tyrimų duomenimis.

9 lent. Atkuriamumo tyrimo, atlikto naudojant reprezentatyvų „MiSeqDx“ cistinės fibrozės 139 variantų tyrimą, rezultatų suvestinė

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vietoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Nepriškyrimų sk.	Nepriškyrimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų 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

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
A	6	F508del / 2183AA > G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del / F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 ³	F508del / W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del / 3272-26A > G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del / 3849 + 10kbC > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621 + 1G > T / 3120 + 1G > A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X / F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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 nėra	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del / 3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H / F508del (HET)	(TG)10 (T)9 / (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621 + 1G > T / 711 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E / 621 + 1G > T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E / F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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	Netaikoma	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

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P / G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Netaikoma	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	Netaikoma	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

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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
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

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Netaikoma	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	Netaikoma	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Netaikoma	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	Netaikoma	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	Netaikoma	100	100

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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	Netaikoma	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R / F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c. 1647T > G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Netaikoma	100	100
B	71	E92X / F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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	Netaikoma	100	100
B	80	F508del / R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del / G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atiktis (%)	Neigiama atiktis (%)	Bendroji atiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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	Netaikoma	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

Grupė	Mėginio nr.	Mėginio genotipas	Variantai	Iš viso priskyrimų vienoje tyrimų vietoje	Teigiami atitinkantys priskyrimai (variantai)			Neigiami atitinkantys priskyrimai (nemutantinio tipo)			Netinkamų priskyrimų sk.	Nepriškimų sk.	Teigiama atitiktis (%)	Neigiama atitiktis (%)	Bendroji atitiktis (%)
					1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta	1 tyrimų vieta	2 tyrimų vieta	3 tyrimų vieta					
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
Iš viso				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Nemutantinio tipo vietoje, atitinkančioje vieno replikato variantą N1303K, užfiksuotas nepriskyrimas dėl nepakankamos aprėpties.

² Vieno 5 ir 75 mėginių replikato priskyrimo dažnis buvo 0 %. Atlikus papildomų tyrimų matyti, kad mėginiai galėjo būti neįdėti į mėginių plokštelę prieš ruošiant bibliotekas, nes mėgintuvėliuose likęs mėginių kiekis atitiko skaičių, kuris būtų teisingas nepašalinus tūrio.

³ Remiantis įrodymais galima teigti, kad, prieš ruošdamas bibliotekas, operatorius sukeitė 9 ir 10 mėginius.

⁴ Nemutantinio tipo vietoje, atitinkančioje kiekvieno iš dviejų mėginių vieno replikato variantą M1V, užfiksuotas nepriskyrimas dėl nepakankamos aprėpties.

„Somatic“ veikimo charakteristikos

Čia aprašytuose tyrimuose naudojant „Somatic Variant“ modulį buvo analizuojami sekos nustatymo duomenys, išskyrus tuos tyrimus, kuriuose buvo naudojama 2 genų grupė ir konkrečiam tyrimui skirtas modulis.

Tikslumas

Siekiant įvertinti „MiSeqDx“ prietaiso DNR, išskirtą iš FFPE mėginių, buvo atlikti trys tyrimai.

1 tyrimas

Tyrimas buvo naudojamas reprezentatyvusis tyrimas, skirtas įvairiems genams analizuoti, apimantis 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų, naudojant 150 amplikonų. Y chromosomoje nėra didelio pasiklojimo sričių, todėl ji nebuvo vertinama. Šiame tyrime naudoti penki unikalūs mėginiai yra iš vienos šeimos – dviejų tėvų ir trijų vaikų – mėginių sekos nustatymas buvo dažnai atliekamas keliose laboratorijose ir taikant kelias sekos nustatymo metodologijas. Trys mėginiai yra moterų, o du – vyrų. Prieš tyrimui išskiriant DNR, visi mėginiai buvo fiksuoti formalinu ir įlieti į parafiną. Mėginys GM12877 DNR lygiu buvo atskiestas su mėginiu GM12878, siekiant sukurti GM12877-D ir variantų, kurių dažnis būtų artimas 5 proc. ir 10 proc., rinkinį. Kiekvienas mėginys buvo iširtas dviem egzemplioriais, išskyrus GM12877-D, kuris buvo tiriamas naudojant penkis replikatus. SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas tyrimo duomenis palyginus su išsamiai apibūdinta referentine duomenų baze. Referentinė duomenų bazė („Platinum Genomes“ 2016-01 versija) buvo sukurta sujungus kelias sekos nustatymo metodologijas, viešai prieinamus duomenis ir informaciją apie paveldėjimą. Remiantis šiuo referentiniu metodu buvo apibrėžtos didelio pasiklojimo geno sritys, nebent nurodyta kitaip. Iš viso buvo atlikti aštuoni mėginių vykdymai; tikslumui parodyti pateiktose lentelėse naudojami pirmojo vykdymo duomenys.

10 lentelėje pateikiami tyrimo duomenys su teigiama ir neigiama procentine atitiktimi kiekvieno mėginio atveju, o variantų rezultatai dėl PPA skaičiavimo palyginami su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu. Trys variantų tipai (SNV, intarpai ir iškritos) sujungiami. Kadangi, taikant referentinį metodą, rezultatai gaunami tik apie vieno nukleotido variantus ir intarpus / iškritas, dėl NPA skaičiavimo ne variantų bazių rezultatai palyginami su žmogaus geno referentinės sekos hg19 versija.

10 lent. „MiSeqDx“ prietaiso bazių priskyrimo rezultatų atitiktis 6 išsamiai apibūdintų mėginių referentiniams duomenims

Mėginys	Vidutinis priskyrimo dažnis	Iš viso variantų	Iš viso TP variantų	Iš viso FN variantų	Iš viso TN priskyrimų	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 Variantai, kurių dažnis didesnis nei 20 %.

² Variantas, kurio dažnis mažesnis nei 20 %.

150 amplikonų buvo skirta įvairiam genomo turiniui apimti. Amplikonų GC turinio intervalas – 26–87 %. Be amplikonų, taip pat pasitaikė įvairių vienkartinį pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Tyrime buvo naudojami 6 unikalūs mėginiai. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (11 lent.) siekiant nustatyti genomo turinio poveikį teisingų priskyrimų procentui. Teisingų priskyrimų procentą sudaro variantų ir referencijos priskyrimai; jei yra neteisingų priskyrimų arba kažkas nepriskiriama, šis procentas yra mažesnis už 100 %. Kai, priskiriant variantus, neįvykdomos vieno ar kelių filtrų sąlygos (pvz., nepakankama aprėptis), niekas nepriskiriama. Neteisingų priskyrimų nebuvo. Įvairių amplikonų nepriskyrimų skaičius daug skyrėsi. GC turinys ir keli sąveikos su GC turiniu atvejai buvo žymiausi nepriskyrimų prognozavimo rodikliai. 2040 / 2580 (79 %) nepriskyrimų įvyko dėl neįvykdytos aprėpties specifikacijos. Daugiausia nepriskyrimų pasitaikė tarp amplikonų, kurių GC turinys didesnis nei 78 %. Su reprezentatyviu amplikonu, kurio GC turinys – 78 %, pasitaikė iš viso 675 nepriskyrimai. Su reprezentatyviu amplikonu, kurio GC turinys – 87 %, pasitaikė iš viso 1365 nepriskyrimai. Aprėptį galima padidinti sumažinant į pratekamąją kiuvetę dedamų mėginių skaičių – taip galima aptikti amplikonus, kurių GC turinio procentas yra didelis.

11 lent. Amplikonų lygio tikslumo duomenys

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analižuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Iš viso teisingų priskyrimų	Iš viso neteisingų priskyrimų	Iš viso nepriskyrimų	Teisingų priskyrimų proc.
1	1	36450499	36450591	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), intarpas / iškrita	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	1050	0	0	100

7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), intarpas / iškrita	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), intarpas / iškrita	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Netaikoma	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Netaikoma	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Netaikoma	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	Netaikoma	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), intarpas / iškrita	0,62	1350	0	0	100

48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), intarpas / iškrita	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Netaikoma	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Netaikoma	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Netaikoma	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Netaikoma	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Netaikoma	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Netaikoma	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Netaikoma	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	Netaikoma	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	Intarpas / iškrita	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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	Netaikoma	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), intarpas / iškrita	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Netaikoma	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	1365	0	0	100

109	17	16084945	16085037	93	93	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita (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), intarpas / iškrita	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	1275	0	0	100

123	18	59773996	59774060	65	65	Netaikoma	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Netaikoma	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Netaikoma	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Netaikoma	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Netaikoma	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Netaikoma	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	Netaikoma
149	Y	2655519	2655609	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	Netaikoma
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Netaikoma

Nepriskirtų variantų suvestinė pateikta 12 lent.. Lentelėje išvardyti konkretūs filtrai, kuriuos naudojant nieko nepriskirta.

12 lent. Variantų nepriskyrimų suvestinė

Amplikono nr.	Chr.:pad.	Variantas	Atitinkamo amplikono turinys	Filtrai	Praleisti variantai	Numatomi variantai
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP ¹ (maža DP)		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	LowDP (maža DP)	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 LowDP (maža DP): maža aprėptis. Variantas filtruojamas, jei bent vieno iš telkinių gylis šioje konkrečioje padėtyje yra mažesnis nei 900.

² R3x6: kartotinis filtras. Variantas filtruojamas, jei visas variantas ar jo dalis pakartotinai matomi referentiniame genome šalia varianto padėties. Reikia, kad referencijoje būtų bent šeši pakartojimai, o atsižvelgiama tik į tuos pakartojimus, kurių ilgis yra iki 3 bp.

Mėginio sekos nustatymo rezultatai buvo palyginti su didelio pasiklovimo lygio NA12878 genotipu, kurį nustatė Nacionaliniai standartų ir technologijų institutai (NIST) (2.19 v.). Iš 150 amplikonų 92 amplikonai buvo didelio pasiklovimo lygio genomo sričių ribose, 41 amplikonas su NIST seka persidengė iš dalies, o 17 amplikonų visiškai nepersidengė. Palyginimui buvo gauta 10 000 vieno replikato koordinacių. Ne variantų bazių priskyrimai buvo palyginti su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija. Tikslumo rezultatai parodyti 13 lentelėje.

13 lent. „MiSeqDx“ prietaiso mėginio GM12878 bazių priskyrimo atitikties NIST referencijai rezultatai

Mėginys	Amplikonų sk.	Vidutinis priskyrimo dažnis	Iš viso TP variantų priskyrimų	Iš viso FN variantų priskyrimų	Iš viso TN priskyrimų	Iš viso FP priskyrimų	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Buvo atlikta papildoma penkių neatskiestų mėginių analizė, susijusi su mažų intarpų ir iškritų (intarpų / iškritų) priskyrimu (14 lent.). Kai kuriais atvejais intarpas / iškrita dažnai pasitaikė tarp dviejų ar daugiau mėginių, kaip matyti stulpelyje „Iš viso mėginių replikatų su intarpu / iškrita“. Penkių mėginių abiejų replikatų rezultatai pateikti 14 lent. Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp. Kiekvienas iš 68 intarpų / iškritų buvo aptikti su teigiama procentine 1 atitiktimi. Trys intarpai ir iškritos teisingų priskyrimų neturėjo, nes kiekvienas iš šių variantų nebuvo priskirtas dėl R3x6 filtro; todėl PPA, į kurią priskyrimai neįtraukti, apskaičiuoti nepavyko. Šie trys variantai – tai 1 bp iškrita (chr8 24811064 AG>A); 2 bp iškrita (chr10 55892600 TAC>T); ir 1 bp intarpas (chr17 39589692 C>CA).

14 lent. Intarpų / iškritų aptikimo „MiSeqDx“ prietaisu suvestinė

Amplikonas	Chromosoma	Padėtis	Analiuzuoto fragmento dydis	Amplikono intarpo / iškritos tipas ir ilgis	Intarpas / iškrita	Iš viso mėginių replikatų su intarpu / iškrita	Nepriskyrimų sk.	Iš viso neteisingų intarpo / iškritos priskyrimų	Iš viso teisingų intarpo / iškritos priskyrimų	PPA
1	1	36450544	93	25 bp iškrita	GAAAATTTAA TGAAACACAT TGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 bp iškrita	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 bp intarpas	T>TTTTAATA GCAAAAAG AGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 bp iškrita	GACAGACTGTG AGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 bp intarpas	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 bp intarpas	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 bp intarpas	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 bp iškrita	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 bp intarpas	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 bp intarpas	C>CTGAAA ATAGGAT	11	0	0	11	100

16	2	235016388	73	2 bp intarpas	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 bp iškrita	TAACCTAA AATTACAAA ATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 bp intarpas	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 bp iškrita	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 bp iškrita	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	11 bp intarpas	T>TTATGG TATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 bp iškrita	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 bp intarpas	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 bp iškrita	CCCTGGG TGCTATAG CCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 bp iškrita	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 bp iškrita	CTTTCACTT TCCCGTCTCA TGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 bp iškrita	GGCATGAG GCTTGGTGA CATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 bp intarpas	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 bp iškrita	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 bp intarpas	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 bp iškrita	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 bp iškrita	GAATCT GCACTT>G	13	0	0	13	100

52	8	24811064	90	1 bp iškrita	AG>A	15	15	0	0	Netaikoma
53	8	76518677	67	4 bp intarpas	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 bp intarpas	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 bp iškrita	TCTGGGGG GCAGCCCC TGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 bp iškrita	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 bp iškrita	AGCGTCTATA ACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 bp iškrita	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 bp intarpas	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 bp intarpas	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 bp iškrita	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 bp iškrita	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 bp intarpas	T>TTCTCAG TACGGTGAA CCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 bp intarpas	C>CAAAATA TAAAAAGC TCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 bp intarpas	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 bp iškrita	ATCTATT TCTAATAGA CGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 bp iškrita	TTTAAAAT TTGAATGTGA TAAAA>T	15	0	0	15	100

90	14	58050081	81	4 bp intarpas	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 bp iškrita	CTTGCTCTAT AAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 bp iškrita	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 bp iškrita	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 bp iškrita	GCCCCTGAG CCAGCCTCCC GCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 bp intarpas	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 bp intarpas	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 bp iškrita	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 bp iškrita	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 bp intarpas	A>ATCCTATTC TACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 bp intarpas	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 bp intarpas	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 bp intarpas	T>TTCTGAAG GTCAAGTCTA TCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 bp iškrita	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 bp iškrita	TTTGATC TGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 bp intarpas	T>TGTATCT TAGCAAAAG TTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 bp intarpas	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 bp iškrita	ACT>A	13	0	0	13	100

130	20	21766863	70	15 bp iškrita	TACTTGAGA ACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 bp intarpas	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 bp intarpas	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 bp iškrita	TCCTGGCTG GCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 bp intarpas	G>GATAAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 bp iškrita	ACTCAAGA TAACTCATG TTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 bp iškrita	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 bp intarpas	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 bp intarpas	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 bp iškrita	GGGCACA GGCA>G	7	0	0	7	100

2 tyrimas

Šiame tyrime buvo naudojami biobanke sukaupti kolorektalinio vėžio apimtų audinių FFPE mėginiai ir reprezentatyvūs 2 genų tyrimas, kuris buvo palygintas su referentiniu metodu – dvikrypčiu Sangerio sekos nustatymu (Sangerio metodas). Iš 1183 tiriamųjų 441 tiriamojo Sangerio metodo ir reprezentatyviojo tyrimo rezultatai buvo tinkami. Įvertinus tiriamųjų lygiu (15 lent.), iš 441 tiriamųjų 230 buvo teigiami naudojant Sangerio metodą (Sangerio metodu aptikta mutacija); iš jų 227 buvo teigiami atlikus reprezentatyvų tyrimą. Taikant Sangerio metodą, likę 211 iš 441 tiriamųjų buvo neigiami (taikant Sangerio metodą mutacijų neaptikta); iš jų 206 buvo neigiami atlikus reprezentatyvų tyrimą. Todėl teigiama procentinė atitiktis (PPA) buvo 98,7 %, o neigiama procentinė atitiktis (NPA) – 97,6 % (15 lent.).

15 lent. Tiriamųjų lygio rezultatų teigiama ir neigiama procentinė atitiktis

Reprezentatyvusis tyrimas	Sangerio metodas		Iš viso
	Teigiama	Neigiama	
Teigiama	227 ¹	5	232
Neigiama	3 ²	206	209
Iš viso	230	211	441

Atlikto tyrimo suvestinė

Atitikties statistika	Taškinis įvertis	Tikslusis 95 % PI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Buvo gautos 224 tikslios vidinio tiriamųjų tyrimo visų mutacijų lygio rezultatų atitiktys; 2 tiriamiesiems „MiSeqDx“ aptiko Sangerio metodu aptiktą mutaciją ir 1 papildomą mutaciją; 1 tiriamajam naudojant „MiSeqDx“ ir Sangerio metodu aptiktos mutacijos buvo skirtingos.

²Vienam tiriamajam Sangerio metodu buvo aptiktos 2 mutacijos; 2 tiriamiesiems Sangerio metodu aptikta viena mutacija.

3 tyrimas

Šiuo tyrimu buvo įvertintos DNR bibliotekos, paruoštos su kelių tipų audinių FFPE mėginiais. Iš viso – 109 FFPE mėginiai iš aštuonių skirtingų audinių (gaubtinės žarnos, kiaušidžių, kasos, antinksčio, šlapimo pūslės, kepenų, skydliaukės ir krūties); kiekvieno tipo audinys apima mažiausiai 11 FFPE mėginių. Antinksčio audinyje buvo stemplės, plaučių, gaubtinės žarnos navikų metastazių; kitame audinyje buvo pirminių navikų. Šiame tyrime buvo naudojamas reprezentatyvusis tyrimas, skirtas 26 genams, apimantiems 21 577 bazes iš 17 skirtingų chromosomų, analizuoti. Buvo atlikta iš viso 6 skirtingų genų (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* ir *BRAF*) Sangerio sekos nustatymas, jį atliekant kiekvieno naviko 1–3 genams, atsižvelgiant į numatomą somatinių to naviko mutacijų paplitimą. Sangerio sekos nustatymu nustatytos 39 SNV somatinės mutacijos 33 iš 109 FFPE mėginių. „MiSeqDx“ nustatė 36 SNV somatines mutacijas 32 iš 109 FFPE mėginių, 1 klaidingą neigiamą ir 2 variantų padėčių nepriskyrimus. PPA buvo 97,3 %. „MiSeqDx“ nustatė 78 975 referentines bazes 109 FFPE mėginiuose, 29 klaidingus teigiamuosius Sangerio sekos nustatymo atžvilgiu ir 2437 nepriskyrimus. NPA buvo 99,9 %. Taikant šiuos du metodus, nustatyta sutampanti dviejų bazių iškrita. 16 lentelėje rezultatai apibendrinami pagal audinio tipą.

16 lent. Teigiama ir neigiama procentinė atitiktis pagal audinio tipą

Audinio tipas	Mėginių sk.	Iš viso variantų	Iš viso TP variantų	Iš viso FN variantų	Iš viso TN priskyrimų	Iš viso FP priskyrimų	Iš viso nepriskyrimų	PPA	NPA
Antinkstis	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Šlapimo pūslė	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Krūtis	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Gaubtinė žarna	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Kepenys	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Kiaušidės	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Kasa	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Skyd liaukė	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Iš viso	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	>99,9

Atkuriamumas

Siekiant įvertinti „MiSeqDx“ prietaiso atkuriamumą, kai jis naudojamas su DNR, išskirta iš FFPE mėginių, buvo atlikti du tyrimai. 1-ajame tyrime buvo naudojami keli prietaisai; 2-ajame tyrime – kelios tyrimų vietos.

1 tyrimas

„MiSeqDx“ prietaiso atkuriamumas buvo nustatytas naudojant du prietaisus ir du kvalifikuotus operatorius (iš viso atlikti aštuoni vykdymai). Reprezentatyvusis tyrimas, amplikonų geno kontekstas, mėginiai ir referentinis metodas yra tokie patys, kaip aprašyta pirmiau nurodyto 1 tikslumo tyrimo atveju. Pateikiami kiekvieno prietaiso kiekvieno amplikono rezultatai (17 lent.), siekiant parodyti priskyrimo atkuriamumą visuose prietaisuose. Į teisingų priskyrimų procentą įtraukti ir neteisingi priskyrimai, ir nepriskyrimai (neįvykdytos vieno ar kelių variantų priskyrimo filtrų sąlygos). Prietaisai generavo panašų nepriskyrimų skaičių, priklausanti nuo konkretaus amplikono. Buvo užfiksuotas vienas neteisingas „MiSeqDx 1“ priskyrimas didelio pasiklovimo srityje, kaip apibrėžiama „Platinum Genomes“ referentiniu standartu. Neteisingas priskyrimas buvo klaidingai teigiamas intarpo varianto priskyrimas 64 amplikone, analizuojančiame 10 chromosomos padėtis nuo 55892599 iki 55892687; amplikone nustatyta 11 dinukleotidų pakartojimų.

17 lent. Skirtingų „MiSeqDx“ prietaisų atkuriamumo tyrimo rezultatai (amplikonų lygis)

Amplikonas	Chromosoma	Anali- zuoto frag- mento dydis	Bazės didelio pasi- kliovimo srityse	Ampli- konų genomo turinys	GC turinys	M70215			M70217		
						Iš viso tei- singų pri- skyrimų	Iš viso netei- singų pri- skyrimų	Iš viso nepri- skyrimų	Iš viso tei- singų pri- skyrimų	Iš viso netei- singų pri- skyrimų	Iš viso nepri- skyrimų
1	1	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), intarpas / iškrita	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), intarpas / iškrita	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	4800	0	0	4800	0	0

10	2	85	81	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), intarpas / iškrita	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Netaikoma	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Netaikoma	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Netaikoma	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	Netaikoma	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), intarpas / iškrita	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), intarpas / iškrita	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Netaikoma	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Netaikoma	0,42	4980	0	0	4980	0	0

52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Netaikoma	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Netaikoma	0,51	4860	0	0	4860	0	0

67	11	97	96	Netaikoma	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Netaikoma	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Netaikoma	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	Netaikoma	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	Intarpas / iškrita	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,52	4380	0	0	4379	0	1

84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), intarpas / iškrita	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), intarpas / iškrita	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Netaikoma	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita (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), intarpas / iškrita	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Netaikoma	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Netaikoma	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Netaikoma	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Netaikoma	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Netaikoma	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), intarpas / iškrita	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Intarpas / iškrita	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), intarpas / iškrita	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), intarpas / iškrita	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	Intarpas / iškrita	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Netaikoma	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	5818	0	2	5816	0	4

143	22	99	99	Netaikoma	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Intarpas / iškrita	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	Netaikoma	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Atkuriamumo tyrimo rezultatai buvo analizuojami kiekvieno operatoriaus atžvilgiu, naudojant variantų dažnį (18 lent.). Šia analize parodyta, kad visų operatorių variantų dažniai buvo nuoseklūs. Pateikiami vidutiniai variantų dažniai \pm 1 standartinis nuokrypis.

18 lent. „MiSeqDx“ prietaiso skirtingų operatorių rezultatai

Variantų dažnių diapazonas	Unikalių variantų sk.	Iš viso išanalizuotų 1 operatoriaus variantų	Iš viso išanalizuotų 2 operatoriaus variantų	1 operatoriaus vidutinis (SD) deklaruotas variantų dažnis	2 operatoriaus vidutinis (SD) deklaruotas variantų dažnis
Didelis dažnis (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 \pm 0,05	0,96 \pm 0,05
Vidutinis dažnis (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04
Mažas dažnis (3–7 %)	620	618	612	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01

Kiekvieno mėginio atkuriamumo tyrimo rezultatai rodomi sujungti iš visų aštuonių vykdymų (19 lent.). Kiekvieno varianto tipo – SNV, intarpų ir iškritų – aptikimas įvertinamas atskirai. Referentinės padėties neįtraukiamos. Šia analize parodyta, kad variantų rezultatai atkuriami pasirinkus visus mėginius.

19 lent. „MiSeqDx“ prietaiso kiekvieno mėginio bazių priskyrimo rezultatų atitiktis

Mėginys	SNV				Intarpai				Iškritos			
	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN	Iš viso	Iš viso TP	Iš viso FP	Iš viso FN
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 Variantai, kurių dažnis didesnis nei 20 %.

² Variantas, kurio dažnis mažesnis nei 20 %.

8-iais šio atkuriamumo tyrimo vykdymais gauti duomenys pagrindžia teiginį, kad „MiSeqDx“ prietaisas gali nuosekliai atlikti sekos nustatymą toliau nurodytais atvejais.

- GC turinys ≥ 19 % (visos priskirtos bazės 120 iš 120 nuskaitytos sekos amplikonuose: 19 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 3,4 %)
- GC turinys ≤ 73 % (visos priskirtos bazės 120 iš 120 nuskaitytos sekos amplikonuose: 73 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 0,1 %)
- PolyA ilgis ≤ 8 (8 nukleotidų PolyA pakartojimas buvo teisingai priskirtas 120 iš 120 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyA = 8)
- PolyT ilgis ≤ 10 (10 nukleotidų PolyT pakartojimas buvo teisingai priskirtas 120 iš 120 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyT = 10)
- PolyG ilgis ≤ 6 (6 nukleotidų PolyG pakartojimas buvo teisingai priskirtas 720 iš 720 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyG = 6)
- PolyC ilgis ≤ 6 (6 nukleotidų PolyC pakartojimas buvo teisingai priskirtas 359 iš 360 nuskaitytos sekos amplikonų, kurių sudėtyje buvo PolyC = 6, 1 nepriskyrimas)
- Pasikartojančių dinukleotidų ilgis $\leq 4x$ (visos priskirtos bazės 600 iš 600 nuskaitytos sekos amplikonų su 4x pasikartojančių dinukleotidų buvo priskirtos tinkamai, o nepriskyrimo dažnis – 0,4 %)
- Pasikartojančių trinukleotidų ilgis $\leq 5x$ (visos priskirtos bazės 120 iš 120 nuskaitytos sekos amplikonų su 5x pasikartojančių trinukleotidų buvo priskirtos tinkamai, o nepriskyrimo dažnis – 1,9 %)

- 24 arba mažiau bazių intarpų ir 25 arba mažiau bazių iškritų
 - 24 bazių intarpai teisingai priskirti 120 iš 120 mėginių
 - 25 bazių iškritos teisingai priskirtos 182 mėginiuose, o deklaruotos kaip nepriskirtos 2 mėginiuose iš 184 mėginių

2 tyrimas

Siekiant įvertinti reprezentatyviojo 2 genų tyrimo atkuriamumą, 3 išorinėse tyrimų vietose (vienoje vietoje 2 operatoriai), naudojant 1 reagentų partiją 3 tyrimų dienas (ne iš eilės) buvo atliktas išorinis tyrimas, aprašytas 2-ajame tikslumo tyrime. Bandymai buvo vykdomi naudojant 6 išsamiai apibūdintas genomo DNR mėginių grupes iš klinikinių FFPE mėginių ar ląstelių linijų. Kiekvieną grupę sudarė 10 narių, visose grupėse iš viso buvo 60 narių.

60 grupių narių sudarė keturių unikalių nemutantinio tipo (grupių mutacijos) mėginių, dvylikos unikalių mutantinio tipo mėginių (su viena mutacija), paruoštų esant tiek dideliame, tiek mažam mutacijų dažniui, ir dviejų unikalių mutantinio tipo mėginių (su viena mutacija), paruoštų esant tik mažam mutacijų dažniui, dublikatai. Tiriant kiekvieną unikalų mėginį / mutacijų dažnio lygio mėginį (kiekvieno vykdymo metu bandytą dviem egzemplioriais), gauti 36 galimi rezultatai (2 replikatai × 2 operatoriai × 3 dienos × 3 vietos) (jei visi rezultatai galiojo).

Procentinis numatomas visų teigiamų ir neigiamų variantų priskyrimas (PEC) buvo įvertintas reprezentatyviojo tyrimo rezultata palyginant su numatomu kiekvieno mėginio mutacijų rezultatu (aptikta ar neaptikta numatoma mutacija). PEC apskaičiuojamas numatomų priskyrimų skaičių padalijant iš bandytų priskyrimų skaičiaus ir rezultata padauginus iš 100 %. Dvipusis 95 % pasiklovimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono vertinimo metodą.

Apibendrinus duomenis visose tyrimų vietose, atliekant pirmąjį mėginio vykdymą arba bandant mėginius, galiojusius pirmojo tyrimo metu, sėkmingai ištirtų mėginių procentas buvo $\geq 94,7\%$. Visų mutantinio tipo mėginių mutacijų lygio PEC buvo 99,6 % (905 / 909) (95 % PI; 98,9, 99,8). Visų 56 grupės mutacijų bandytų priskyrimų skaičius tiriant visus galiojančius mėginius (neatsižvelgiant į tai, ar aptikta mutacija buvo numatyta, ar ne) buvo 58 856 (56 × 1051). Iš šių 58 856 mutacijų lygio stebėjimų pasitaikė tik 6 atvejai, kai užfiksuoti ir numatomi rezultatai buvo prieštaringi; bendrasis visų teigiamų ir neigiamų variantų mutacijų lygio PEC tiriant visus mutantinio ir nemutantinio tipo grupių narius buvo 99,99 % (58 850 / 58 856).

Analitinis jautris (tuščiosios vertės riba (LoB) ir aptikimo riba (LoD))

Šiuo tyrimu patvirtinta tyrimo ribinė vertė ir nustatyta „MiSeqDx“ aptikimo riba (LoD) (naudojant reprezentatyvią grupę). Glaustai: išsamiai apibūdintos „Platinum Genome“ ląstelių linijos GM12878 ir GM12877 buvo fiksuotos formalinu ir įlietos į parafiną, o tada buvo išskirta DNR. GM12878 buvo atskiesta linija GM12877, kad septyniasdešimties variantų (52 SNV, devynių intarpų ir devynių iškritų) dažniai būtų artimi 0,05. Du DNR mėginius tyrė du operatoriai, naudodami du prietaisus ir dvi reagentų partijas: iš viso buvo atlikta 10 „MiSeqDx“ sekos nustatymo vykdymų. Taip kiekvienoje reagentų partijoje gauta 40 kiekvieno GM12878 varianto replikatų ir 60 kiekvienos atitinkamos nemutantinio tipo GM12877 koordinatės replikatų. LoB ir LoD buvo apskaičiuotos įprastu metodu, nurodytu CLSI EP17-A2 dokumente, naudojant neparimetrinę parinktį. SNV, intarpų ir iškritų LoB bei LoD buvo apskaičiuotos atskirai, kaupiant konkretaus varianto tipo dažnius. I tipo klaida buvo apibrėžta kaip 0,01, o II tipo – kaip 0,05.

LoB atveju sukaupti variantų dažniai buvo surikiuoti nuo žemiausio iki aukščiausio ir buvo apskaičiuota 99-oji kiekvieno varianto tipo kiekvienos reagentų partijos klasifikacijos padėtis (20 lent.). Kokybiniam variantų aptikimui nustatyti „MiSeqDx“ programinė įranga naudoja 0,026 variantų dažnio ribinę vertę (tikrąją LoB). Apskaičiavus tuščiosios vertės ribas buvo patvirtinta, kad, taikant šią ribinę vertę, I tipo klaidos dažnis yra ne didesnis nei 0,01.

20 lent. Tuščiosios vertės riba

Varianto tipas	Iš viso variantų dažnių	1-osios reagentų partijos LoB (%)	2-osios reagentų partijos LoB (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Intarpas	540	0,79	0,60
Iškrita	540	0,96	0,84

LoD atveju buvo apskaičiuota kiekvieno varianto tipo kiekvienos reagentų partijos atskiro mutacijos dažnio procentinė dalis, mažesnė nei ribinė 0,026 vertė (21 lent.). Kadangi šios procentinės dalys buvo mažesnės už II tipo klaidos dažnį (5 %, 0,05), kaip LoD buvo apskaičiuota sujungtų variantų dažnių mediana (22 lent.). Kaip kiekvieno varianto tipo LoD buvo paimta didesnioji iš apskaičiuotų dviejų reagentų partijų verčių – 5,45 % SNV atveju, 4,88 % – intarpų ir 5,44 % – iškritų.

21 lent. Aptikimo riba

Reagentų partija	Varianto tipas	Iš viso variantų dažnių	VF matavimų sk. < 2,6 %.	VF matavimų % < 2,6 %.	Aptikimo riba (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Intarpas	360	0	0,00	4,86
	Iškrita	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Intarpas	360	0	0,00	4,88
	Iškrita	360	0	0,00	5,24

Toliau pateiktais tyrimais parodomas „MiSeqDx“ veikimo charakteristikos atliekant kitą reprezentatyvų tyrimą, orientuotą į 56 mutacijas dviejuose klinikiniu požiūriu svarbiuose vėžio genuose (mutacijų grupė). Mutacijų grupė sukurta siekiant aptikti konkrečias 56 mutacijas dviejuose klinikiniu požiūriu svarbiuose vėžio genuose (1 genas ir 2 genas). Atliekant tyrimą, tuo pačiu metu aptinkama, ar kiekviena iš 56 mutacijų kiekviename nuskaitytos sekos mėginyje yra, ar jos ten nėra. Šių tyrimų referentinis metodas buvo dvikryptis Sangerio sekos nustatymas.

Skirtingų partijų tikslumas

Buvo atliktas skirtingų partijų tikslumo tyrimas, siekiant įvertinti „MiSeqDx“ prietaiso veikimą naudojant skirtingas pagamintas reagentų rinkinio partijas (įskaitant mėginių kvalifikaciją, bibliotekų paruošimą ir sekos nustatymo reagentus); buvo atliekamas 2 genų reprezentatyvusis tyrimas naudojant 5 sumaišytų FFPE mėginių, atitinkančių mėginių kvalifikacijos reikalavimus, grupę. Kiekviename FFPE mėginyje buvo 2 unikalios mutacijos: viena – mažesnio (maždaug 8 %) dažnio lygio ir viena – didesnio (maždaug 14 %) dažnio lygio. Per 3 dienas (ne iš eilės), naudojant 3 reagentų rinkinio partijas, buvo surinkta dvylika (12) kiekvieno iš 5 mėginių mišinio stebėjimo duomenų. Vykdamas tyrimą, naudojant visas reagentų partijas, iš viso atlikta 180 visų mėginių mišinių stebėjimų ir 360 visų mutacijų dažnių lygių stebėjimų. Naudojant visas partijas, o tyrimus atliekant visas dienas, 99,7 % (359 / 360) stebėjimų metu buvo matomas numatytas mutacijų rezultatas. Viena mažo dažnio mutacija buvo neteisingai priskirta kaip nemutantinio tipo. Siekiant apytikriai nustatyti sistemos kintamumą, buvo atlikta kiekvienos mutacijos / kiekvieno mutacijų dažnio lygio nuokrypio komponentų analizė. Bendrojo standartinio nuokrypio diapazonas buvo 0,011–0,029. Bendrojo standartinio nuokrypio reagentų partijos komponento diapazonas buvo 0–0,015.

Patentai ir prekių ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimu, ir jokių kitų tikslų. Šis dokumentas ir jo turinys negali būti naudojami ar platinami jokių kitų tikslų ir (arba) kitaip negali būti pateikiami, atskleidžiami ar atkuriami kokiu nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių teises, bendras teises nei panašių teisių.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį (-ius) produktą (-us), visas šio dokumento turinys turi būti išsamiai perskaitytas ir suprastas.

NEPERSKAIČIUS VISŲ ČIA PATEIKTŲ INSTRUKCIJŲ IR JOMIS AIŠKIAI NESIVADOVAUJANT, GALI BŪTI SUGADINTAS PRODUKTAS (-AI), SUŽEISTAS NAUDOTOJAS BEI KITI ASMENYS IR PADARYTA ŽALA KITAI NUOSAVYBEI.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS (-I) PRODUKTAS (-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS (-I) NETINKAMAI.

© 2021 m. „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

„Illumina“, „MiSeqDx“, „TruSeq“, moliūgo atspalvio oranžinė spalva ir srautinių duomenų bazių dizainas yra „Illumina, Inc.“ ir (arba) jos filialo (-ų) prekių ženklai JAV ir (arba) kitose šalyse. Visi kiti pavadinimai, logotipai ir prekių ženklai priklauso atitinkamiems savininkams.

Kontaktinė informacija



„Illumina“

5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 JAV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



„Illumina Netherlands B.V.“
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nyderlandai

Užsakovas Australijoje:
„Illumina Australia Pty Ltd“
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australija

Gaminio ženklimas

Visą informaciją apie simbolius, kurie yra ant gaminių pakuočių ir etikečių, rasite simbolių legendoje, pateiktoje svetainės support.illumina.com kortelėje „Documentation and Literature“ (dokumentai ir literatūra), kurioje reikia pasirinkti savo rinkinį.