

# Прилад MiSeqDx®

ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO

№ за каталогом DX-410-1001

## Передбачене використання

Прилад MiSeqDx призначено для таргетного секвенування бібліотек ДНК з геномної ДНК людини, екстрагованої з периферійної цільної крові або зафіксованої у формаліні та залитої парафіном (FFPE) тканини, у разі застосування з діагностичними аналізами *in vitro* (IVD), що виконуються на приладі. Прилад MiSeqDx не призначено для секвенування всього геному або секвенування *de novo*. Прилад MiSeqDx потрібно використовувати із зареєстрованими та переліченими, дозволеними або схваленими реагентами IVD й аналітичним програмним забезпеченням.

## Принципи виконання процедури

Illumina MiSeqDx призначено для таргетного секвенування ДНК людини з використанням витратних матеріалів для секвенування Illumina і бібліотек, приготовлених із геномної ДНК людини, екстрагованої з периферійної цільної крові або FFPE-тканини, за допомогою зареєстрованих і перелічених, дозволених або затверджених реагентів IVD. Приготування бібліотек відбувається через ампліфікацію мішеней і додавання індексів зразків та послідовностей для захоплення. Бібліотеки зразків фіксуються на проточній кюветі та секвенуються на приладі за допомогою хімічної реакції секвенування за допомогою синтезу (SBS). У хімічній реакції SBS використовується метод оборотних термінаторів для виявлення однонуклеотидних основ, тому що їх включено в нитки ДНК, які зростають. Програмне забезпечення для аналізу в режимі реального часу Real-Time Analysis (RTA) виконує аналіз зображень і розпізнавання основ, а потім присвоює оцінку якості до кожної основи для кожного циклу секвенування. Після завершення первинного аналізу розпізнавання основ вони обробляються приладом MiSeqDx у процесі вторинного аналізу. Обробка включає демультиплексування, генерування файлів FASTQ, вирівнювання, розпізнавання варіантів і генерування файлів у форматі розпізнавання варіантів (VCF), у яких міститься інформація про варіанти, знайдені в певних позиціях у референсному геномі. У приладі MiSeqDx використовуються різні модулі для вторинного аналізу залежно від робочого процесу. Доступні модулі для робочих процесів розпізнавання варіантів зародкової лінії або соматичних варіантів, а також модулі для спеціалізованих користувацьких аналізів.

## Завантаження з вибором операційної системи

Завантаження з вибором операційної системи включає апаратні, програмні й інсталяційні процедури, які дають змогу працювати з приладом MiSeqDx як у режимі діагностики *in vitro* (IVD), так і в режимі аналізу секвенування лише для використання в дослідженні (RUO). Завантаження з вибором операційної системи дає змогу користувачу перемикати режими роботи приладу з діагностичного на дослідницький. Радіочастотна ідентифікація (RFID) на витратних матеріалах для секвенування дає змогу запобігти використанню реагентів для секвенування RUO в діагностичних прогонах секвенування.

## Обмеження процедури

- 1 Використовувати для діагностики *in vitro*.
- 2 Результати, представлені в маркуванні, було отримано за допомогою панелей репрезентативного аналізу з використанням периферійної цільної крові або клітинних ліній для варіантів зародкової лінії і FFPE-тканини або клітинних ліній FFPE для соматичних варіантів із застосуванням описаних реагентів і модулів програмного забезпечення. Технічні характеристики представлено лише з метою інформування. Представлені валідаційні випробування, які вимагаються спеціальними органами контролю для аналізаторів послідовностей ДНК з високою пропускнуою здатністю, призначені лише для демонстрації загальних можливостей приладу й не встановлюють

можливості або придатність приладу відносно конкретних вимог. Усі діагностичні тести, розроблені для цього приладу, вимагають проведення повної валідації відносно всіх аспектів його функціонування.

- 3 Обмеження цього приладу включають:
  - Вихідні дані секвенування  $\geq 5$  Гб
  - Зчитування, що проходять фільтр  $\geq 15$  мільйонів
  - Довжина зчитування (у парному кінцевому прогоні)  $2 \times 150$  п. о.
  - Основи з показником Q вище 30 (Q30)  $\geq 80$  % за довжини зчитування  $2 \times 150$  п. о.  
Щонайменше 80 % основ, які мають оцінки якості за шкалою Phred більше 30, що вказує на точність розпізнавання основ більше 99,9 %.
- 4 Прилад MiSeqDx було валідовано лише для секвенування бібліотек ДНК людини, екстрагованих із периферійної цільної крові й FFPE-тканини. Бібліотеки, згенеровані з інших типів зразків, не можна використовувати в цьому приладі для діагностики *in vitro*. Ефективність цього приладу для секвенування мікробних нуклеїнових кислот у зразках пацієнтів не встановлено.
- 5 Прилад MiSeqDx призначено для використання в діагностиці *in vitro* лише із зареєстрованими й переліченими, дозволеними та затвердженими реагентами й аналізами IVD. Прилад MiSeqDx можна використовувати для діагностики *in vitro* з використанням указаних далі аналізів IVD або зареєстрованих реагентів.

Назва	№ за каталогом	№ документа інструкції з використання
Розширена панель RAS Praxis® (лише США)	20012431	1000000037190
139-варіантний аналіз на муковісцидоз MiSeqDx	DX-102-1004 DX-102-1003	15038347
Аналіз секвенування на муковісцидоз MiSeqDx для використання в клінічній практиці	DX-102-1001	15038344
Користувацький набір ампліконів TruSeq Dx	20005718	1000000029772
Набір реагентів MiSeqDx, версія 3	20012552 / 20037124	1000000030849

Універсальні обмеження реагентів і технічні характеристики, описані в цій інструкції з використання, базуються на репрезентативних аналізах. Що стосується аналізів IVD, див. інструкцію з використання конкретного аналізу, щоб дізнатися про цільове використання, виявлені варіанти й тип зразка.

- 6 Індели (інсерції, делеції та їхні комбінації) довжиною більше 25 п. о. програмним забезпеченням аналізу не вирівнюються. Отже, програмне забезпечення аналізу не виявляє індели довжиною більше 25 п. о.
- 7 Систему було валідовано на виявлення одонуклеотидних варіантів (single nucleotide variants, SNV), делецій до 25 п. о. та інсерцій до 24 п. о. в разі використання з програмним забезпеченням модулів Germline Variant (Варіант зародкової лінії) і Somatic Variant (Соматичний варіант). Для розпізнавань соматичних варіантів із частотою 0,05 було виявлено делеції довжиною 25 п. о. та інсерції довжиною 18 п. о.
- 8 Програмне забезпечення аналізу може не вирівнювати зчитування ампліконів з укрій високим вмістом варіантів. Це призводить до того, що певну область буде зареєстровано як дикий тип. Такий укрій високий вміст передбачає:
  - зчитування, що містять понад три індели;
  - зчитування довжиною щонайменше 30 п. о. з умістом SNV більше 4 % загальної цільової довжини ампліконів (за винятком областей зондів); і
  - зчитування довжиною менше 30 п. о. з умістом SNV більше 10 % загальної довжини ампліконів (включно з областями зондів).
- 9 Великі варіанти, зокрема багатонуклеотидні варіанти (multi-nucleotide variants, MNV) і великі індели, можуть звітуватися як окремі менші варіанти у вихідному файлі VCF.
- 10 Варіанти делецій можна фільтрувати або пропускати під час охоплення двох плиткових ампліконів, якщо довжина делеції дорівнює або перевищує довжину ділянки перекриття між плитковими ампліконами.

- 11 Система не здатна виявляти індели, коли вони виникають прямо поряд із праймером, а амплікон із перекриттям відсутній. Для областей з ампліконами, що перекриваються, аналіз не здатен виявити делеції, коли така область перекриття менша за розмір делеції, яку потрібно виявити. Наприклад, якщо область перекриття між двома суміжними ампліконами становить 2 (дві) основи, аналіз не може виявити жодні делеції, зокрема ці обидві основи. Одноосновну делецію можна виявити в будь-якій із цих основ.
- 12 Як і у випадку з будь-яким робочим процесом підготовки бібліотеки на основі гібридизації, первинні поліморфізми, мутації, інсерції або делеції в областях зв'язування олігонуклеотидів можуть впливати на алелі, що досліджуються, а, отже, розпізнавання під час секвенування. Приклад наведено далі.
  - Варіант у фазі, де варіант розміщено в області праймера, може не піддаватись ампліфікації, що призводить до хибно-негативних результатів.
  - Варіанти в області праймера можуть заважати ампліфікації референсного алелю, що призводить до неправильного розпізнавання гомозиготного варіанта.
  - Варіанти інделів у області праймера можуть призводити до хибно-позитивного розпізнавання в кінці зчитування біля праймера.
- 13 Індели можна фільтрувати завдяки викривленню нитки, якщо вони виникають поруч із кінцем одного зчитування та піддаються м'якому усіченню під час вирівнювання.
- 14 Малі MNV не валідовано.
- 15 Варіанти числа копій або структурні варіанти, наприклад злиття або транслокації, не валідовано.
- 16 Обмеження, що стосуються зародкової лінії.
  - Система MiSeqDx, у якій використовується модуль Germline Variant (Варіант зародкової лінії) диспетчера Local Run Manager, призначено для отримання якісних результатів розпізнавання варіантів зародкової лінії (наприклад, гомозиготних, гетерозиготних, дикого типу).
  - Коли використовується модуль Germline Variant (Варіант зародкової лінії), мінімальне охоплення на амплікон, необхідне для точного розпізнавання варіантів, становить 150x. На охоплення впливають кількість зразків і загальна кількість основ-мішеней. На охоплення може впливати вміст GC та інший геномний вміст.
  - Варіація числа копій може впливати на те, яким буде визначено варіант: гомозиготним чи гетерозиготним.
  - У файлах VCF варіанти в певному повторному контексті відфільтровуються. Для фільтрації варіантів використовується фільтр повторів RMxN, якщо вся послідовність варіанта або її частина повторно присутня в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. Для розпізнавання варіантів зародкової лінії в референсному геномі потрібно не менше 9 повторів, щоб варіант було відфільтровано. До уваги беруться лише повтори довжиною до 5 п. о. (R5x9).
- 17 Обмеження, що стосуються соматичних варіантів.
  - Система MiSeqDx, у якій використовується модуль Local Run Manager Somatic Variant Module, призначено для отримання якісних результатів розпізнавання соматичних варіантів (тобто наявність соматичного варіанта з варіантною частотою не менше 0,026 із межею виявлення 0,05).
  - Коли використовується модуль Somatic Variant (Соматичний варіант), мінімальне покриття на амплікон, необхідне для точного розпізнавання варіантів, становить 450x на пул олігонуклеотидів. На покриття впливають кількість зразків і загальна кількість основ-мішеней. На охоплення може впливати вміст GC та інший геномний вміст.
  - У файлах VCF варіанти в певному повторному контексті відфільтровуються. Для фільтрації варіантів використовується фільтр повторів RMxN, якщо вся послідовність варіанта або її частина повторно присутня в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. Для розпізнавання соматичних варіантів у референсному геномі потрібно не менше 6 повторів, щоб варіант було відфільтровано. До уваги беруться лише повтори довжиною до 3 п. о. (R3x6).
  - Модуль Somatic Variant (Соматичний варіант) не здатен відрізнити варіанти зародкової лінії від соматичних варіантів. Модуль призначений для виявлення варіантів у межах діапазону частот варіантів, але частота варіанта не може використовуватися для диференціації соматичних варіантів від варіантів зародкової лінії.

- Нормальна тканина в зразку впливає на виявлення варіантів. Зареєстрована межа виявлення базується на частоті варіанта відносно загальної ДНК, екстрагованої як із пухлини, так і з нормальної тканини.

## Компоненти виробу

Illumina MiSeqDx містить наведені далі компоненти.

Прилад MiSeqDx (номер за каталогом: DX-410-1001)

Для експлуатації приладу MiSeqDx і аналізу даних потрібне вказане далі програмне забезпечення.

Прикладна програма	Функція	Опис
Системне програмне забезпечення MiSeq (MOS)	Контроль роботи приладу	Прикладне програмне забезпечення MOS керує роботою приладу під час секвенування й генерує зображення для використання в програмному забезпеченні для аналізу в реальному часі (RTA). Докладніше див. <i>Довідковий посібник до приладу MiSeqDx із MOS, версія 2 (документ № 1000000021961)</i> .
Програмне забезпечення для аналізу в режимі реального часу Real-time Analysis (RTA)	Первинний аналіз	Прикладне програмне забезпечення RTA перетворює зображення, згенероване MOS для кожного сегмента на цикл прогону секвенування, на файли розпізнавання основ, які є вхідними для модулів аналізу Local Run Manager. Прикладне програмне забезпечення RTA не має інтерфейсу користувача.
Local Run Manager	Інтерфейс для вибору модуля	Програмне забезпечення Local Run Manager — це інтегроване в прилад рішення для керування користувачами, проведення вторинного аналізу й моніторингу стану приладу. Додаткову інформацію див. у <i>Довідковому посібнику з програмного забезпечення Local Run Manager для MiSeqDx (документ № 1000000011880)</i> .
Модуль Somatic Variant (Соматичний варіант)	Вторинний аналіз	Цей модуль аналізу диспетчера Local Run Manager обробляє розпізнавання основ за допомогою вторинного аналізу. Обробка включає демультіплексування, генерування файлів FASTQ, вирівнювання, розпізнавання варіантів і звітність. Засіб розпізнавання варіантів (Pisces) генерує файли VCF, які містять інформацію про варіанти, знайдені в певних позиціях у референсному геномі, і включає отриману під час вимірювань частоту варіанта.
Модуль Germline Variant (Варіант зародкової лінії)	Вторинний аналіз	Цей модуль аналізу диспетчера Local Run Manager обробляє розпізнавання основ за допомогою вторинного аналізу. Обробка включає демультіплексування, генерування файлів FASTQ, вирівнювання, розпізнавання варіантів і звітність. Засіб розпізнавання варіантів (Pisces) генерує файли VCF, які містять інформацію про варіанти, знайдені в певних позиціях у референсному геномі, й ідентифікує кожний варіант як гетерозиготний або гомозиготний.

## Зберігання й поводження

Показник	Вимога
Температура	Транспортування та зберігання: від -10 до 40 °C (від 14 до 104 °F) Умови експлуатації: від 19 до 25 °C (від 66 до 77 °F)
Вологість	Транспортування та зберігання: вологість за відсутності конденсації Умови експлуатації: 30–75 % відносної вологості за відсутності конденсації

## Необхідні обладнання й матеріали, які не були надані

Витратні матеріали для секвенування

Набір реагентів MiSeqDx, версія 3 (номер за каталогом 20012552 / 20037124)

## Витратні матеріали, що замовляє користувач

Перед початком прогону перевірте наявність наведених нижче витратних матеріалів, що замовляє користувач.

Витратний матеріал	Призначення
Серветки, просочені ізопропіловим спиртом, 70 %, чи етанолом, 70 %	Очищення скла проточної кювети й платформи
Лабораторна серветка з низьким виділенням ворсу	Очищення платформи проточної кювети
Папір для протирання оптичних скелець, 4 × 6 дюймів	Очищення проточної кювети
Tween 20	Промивання приладу
Пінцет із прямокутними кінцями, пластик (додатково)	Видалення проточної кювети з транспортного контейнера проточної кювети
Вода для застосовування в лабораторіях	Промивання приладу

## Рекомендації стосовно води для застосовування в лабораторіях

Для виконання процедур на приладі завжди використовуйте воду для застосовування в лабораторіях. За жодних обставин не використовуйте водопровідну воду.

Прийнятними варіантами є наведені далі.

- Illumina PW1.
- Вода з опором 18 мегаОм (МОм).
- Вода Milli-Q.
- Вода Super-Q.
- Вода для молекулярної біології.

## Застереження

### ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Федеральний закон дозволяє продаж цього виробу лише за призначенням або на замовлення лікарів або інших спеціалістів, які займаються медичною практикою, що мають ліцензію від штату, у якому вони здійснюють свою практику, з метою використання або замовлення на використання цього виробу.

- 1 **Деякі компоненти реагентів, наданих компанією Illumina для використання з приладом MiSeqDx, містять потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може спричинити шкоду здоров'ю. Надягайте захисне приладдя, зокрема захист очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосованих регіональних, державних і місцевих законів і нормативних правил.** Щоб отримати інформацію про захист навколишнього середовища, здоров'я та безпеку, див. паспорт безпеки продукції на сайті [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Зі зразками крові слід поводитися так, ніби вони заражені вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусом гепатиту В людини (HBV) або іншими збудниками, що передаються через кров (універсальні заходи застереження).
- 3 Недотримання викладених процедур може призвести до неправильних результатів або значного погіршення якості зразка.
- 4 Використовуйте стандартні заходи застереження, прийняті в лабораторії. Не використовуйте піпетування ротом. Не вживайте їжу або напої та не паліть у робочих зонах. Під час роботи зі зразками та реагентами з набору надягайте одноразові рукавички й лабораторний одяг. Після роботи зі зразками та реагентами з набору ретельно мийте руки.
- 5 Належні правила поводження та гігієна в лабораторії є обов'язковими для попередження забруднення реагентів, приладів та інструментів, а також геномних зразків ДНК продуктами ПЛР. Забруднення продуктами ПЛР може призвести до неправильних і ненадійних результатів.

- 6 Щоб попередити забруднення, виділіть для зон преампліфікації та постампліфікації спеціальне обладнання й витратні матеріали (як-от піпетки, наконечники піпеток, термостати, вихрові мішалки й центрифуги).
- 7 Парування індексів і зразків має точно відповідати роздрукованому макету планшета. Під час уведення імені зразка в диспетчер Local Run Manager він автоматично заповнює праймери індексу, пов'язані з іменем зразка. Перед початком прогону секвенування рекомендується перевіряти зв'язок праймерів індексу зі зразками. Невідповідність між зразком і результатами макету планшета завадить виявленню позитивного зразка та призведе до отримання хибного результату.
- 8 Наполегливо рекомендується встановити антивірусне програмне забезпечення, що замовляє користувач, для захисту комп'ютера від вірусів. Інструкції з установаження можна знайти в посібнику користувача.
- 9 Забороняється працювати на приладі MiSeqDx, коли з нього знято будь-яку з панелей. Експлуатація приладу, з якого знято хоча б одну з панелей, створює потенційну небезпеку від дії напруги електричної мережі й напруги постійного струму.
- 10 Не торкайтеся платформи проточної кювети у відсіку проточної кювети. Нагрівач у цьому відсіку працює за температури від 22 °C до 95 °C, що може призвести до опіків.
- 11 Цей прилад важить приблизно 57 кг (126 фунтів) і внаслідок падіння або неправильного поводження може призвести до важкого травмування.

## Інструкції з використання

Наведені нижче інструкції з використання приладу MiSeqDx потребують використання реагентів, наданих у наборі реагентів MiSeqDx версії 3.

### Створення прогону за допомогою диспетчера Local Run Manager

Докладні інструкції див. у *Довідковому посібнику з програмного забезпечення Local Run Manager (документ № 1000000011880)* і посібнику до модуля диспетчера Local Run Manager для модуля аналізу, який ви застосовуєте.

- 1 Натисніть **Create Run** (Створити прогін) і виберіть один із модулів для аналізу диспетчера Local Run Manager: Somatic Variant (Соматичний варіант) або Germline Variant (Варіант зародкової лінії).
- 2 Уведіть ім'я прогону, яке ідентифікує прогін від секвенування до аналізу.
- 3 Використовуйте літери та цифри, пробіл, підкреслювання або дефіс.
- 4 [Додатково] Уведіть опис прогону, який допоможе його ідентифікувати. Використовуйте літери та цифри, пробіл, підкреслювання або дефіс.

### Імпорт файлів маніфесту для прогону

- 1 Переконайтеся, що файли маніфесту, які вам потрібно імпортувати, доступні в мережевому розташуванні, підключеному до приладу, або на USB-накопичувачі.
- 2 Натисніть **Import Manifests** (Імпорт маніфестів).
- 3 Перейдіть до файлу маніфесту та виберіть маніфести, які хочете додати.

### Задання зразків для прогону


Задати зразки для прогону можна за допомогою описаних далі варіантів.

**Enter samples manually** (Увести зразки вручну) — скористайтеся порожньою таблицею на екрані Create Run (Створення прогону).


**Import samples** (Імпорт зразків) — перейдіть до зовнішнього файлу відповідного формату. Шаблон можна завантажити на екрані Create Run (Створення прогону).

Після заповнення таблиці зразків ви можете експортувати інформацію про зразки в зовнішній файл і використовувати його як довідкову інформацію під час приготування бібліотек або ж імпортувати файл для іншого прогону.

## Уведення зразків уручну

- 1 Виберіть кількість зразків та набори індексів у розкритому списку.
- 2 Уведіть унікальне ім'я зразка (для модуля аналізу *Somatic Variant (Соматичний варіант)*) або ідентифікаційний номер зразка (для модуля аналізу *Germline Variant (Варіант зародкової лінії)*). Використовуйте літери та цифри, дефіс або підкреслювання.  
У модулі аналізу *Somatic Variant (Соматичний варіант)* ім'я зразка, уведене для одного зразка, автоматично поширюється на відповідну лунку іншого пула.
- 3 [Додатково] Для зразків позитивного й негативного контролю клацніть правою клавішею миші й виберіть тип контролю.  
У модулі аналізу *Somatic Variant (Соматичний варіант)* контрольний набір одного зразка автоматично поширюється на відповідний пул із таким самим контролем.
- 4 [Додатково] Виберіть вкладку *Description (Опис)* і введіть опис зразка. Використовуйте літери та цифри, дефіс або підкреслювання.  
У модулі аналізу *Somatic Variant (Соматичний варіант)* опис, уведений для одного зразка, автоматично поширюється на відповідну лунку іншого пула.
- 5 Натисніть вкладку **Index 1 (i7)** (Індекс 1 (i7)) і виберіть адаптер індексу 1 із розкритого списку.
- 6 Натисніть вкладку **Index 2 (i5)** (Індекс 2 (i5)) і виберіть адаптер індексу 2 із розкритого списку.
- 7 Виберіть файл маніфесту з розкритого списку *Manifest (Маніфест)*.  
У модулі аналізу *Somatic Variant (Соматичний варіант)* для зразків у пулі А потрібен інший маніфест, ніж для зразків у пулі В.
- 8 Оберіть варіант для перегляду, друку або збереження макету планшета як довідкового матеріалу для приготування бібліотек.
  - Натисніть значок  **Print (Друк)**, щоб відобразити макет планшета. Виберіть **Print (Друк)**, щоб роздрукувати макет планшета.
  - Виберіть **Export (Експорт)**, щоб експортувати інформацію про зразки до зовнішнього файлу.
- 9 Виберіть **Save Run (Зберегти прогін)**.

## Імпорт зразків

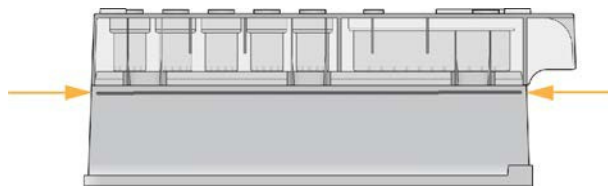
- 1 Натисніть **Import Samples (Імпорт зразків)** і перейдіть до розташування інформаційного файлу зразка. Ви можете імпортувати два типи файлів.
  - Виберіть **Template (Шаблон)** на екрані *Create Run (Створити прогін)*, щоб створити новий макет планшета. Файл шаблону містить правильні заголовки стовпчиків для імпорту. Уведіть інформацію про зразок у кожний стовпчик для зразків у прогоні. Видаліть приклад даних із невикористаних клітинок і збережіть файл.
  - Використайте файл із даними зразків, який було експортовано з модуля аналізу за допомогою функції *Export (Експорт)*.
- 2 Натисніть на значок  **Print (Друк)**, щоб відобразити макет планшета.
- 3 Виберіть **Print (Друк)**, щоб роздрукувати макет планшета як довідковий матеріал під час підготовки бібліотек.
- 4 Виберіть **Save Run (Зберегти прогін)**.

## Підготовка картриджа з реагентами

Подані далі інструкції описують, як розморожувати реагенти за допомогою водяної бані за кімнатної температури.

- 1 Вийміть картридж із реагентами з місця зберігання, у якому підтримується температура від  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Помістіть картридж із реагентами у водяну баню, яка містить достатньо деіонізованої води кімнатної температури для занурення основи картриджа з реагентами до лінії рівня води, надрукованої на картриджі з реагентами. Не допускайте, щоб вода перевищувала лінію максимального рівня.

Рисунок 1 Лінія максимального рівня води



- Нехай картридж із реагентами розморожується на водяній бані за кімнатної температури протягом 60–90 хвилин або до повного розморожування.
- Вийміть картридж із водяної бані та обережно постукайте ним по столу, щоб видалити воду з основи картриджа. Просушіть основу картриджа. Переконайтеся, що на верхній частині картриджа з реагентами відсутні бризки води.

### Перевірка картриджа з реагентами

- Щоб змішати розморожені реагенти, переверніть картридж із реагентами десять разів, а потім переверте, чи розморожені всі його положення.

#### ПРИМІТКА

Дуже важливо, щоб реагенти в картриджі були ретельно розморожені та змішані для забезпечення належного секвенування.

- Перевірте реагенти в положеннях 1, 2 та 4, щоб переконатися, що вони повністю змішалися й не містять осадів.
- Обережно постукайте картриджем по столу, щоб зменшити кількість бульбашок повітря в реагентах.

#### ПРИМІТКА

Трубки-сіппери MiSeqDx доходять до дна кожного резервуара для аспірації реагентів, тому важливо, щоб резервуари не містили бульбашок повітря.

- Помістіть картридж із реагентами на кригу або залиште його за температури від 2 °C до 8 °C (до 6 годин), доки він не буде готовий до налаштування прогону. Для отримання найкращих результатів перейдіть безпосередньо до завантаження зразка та налаштування прогону.

### Підготовка зразків для секвенування

Указівки щодо підготовки бібліотек зразків для секвенування, зокрема щодо розведення й об'єднання бібліотек, див. у розділі «Інструкції з використання» на вкладиші упаковки набору для підготовки бібліотеки.

Розведення бібліотек зразків залежить від складності олігонуклеотидних пулів. Щільність кластера в MiSeqDx необхідно оптимізувати, і оптимальна щільність залежить від конкретного аналізу підготовки бібліотеки.

### Завантаження бібліотек зразків до картриджа

Коли картридж із реагентами повністю розморожений і готовий до використання, тоді зразки можна завантажувати до картриджа.

- Використовуйте окремий, чистий і порожній наконечник піпетки на 1 мл, щоб проколоти покриття з фольги резервуара на картриджі з реагентами, марковане **Load Samples** (Завантажити зразки).

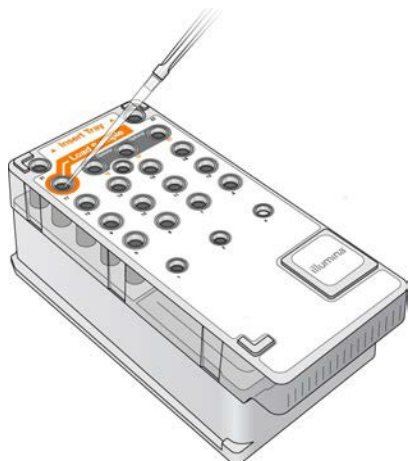
#### ПРИМІТКА

Не проколюйте будь-які інші елементи з реагентами. Інші елементи з реагентами проколюються під час прогону автоматично.

- Внесіть піпеткою 600 мкл бібліотек зразків **DAL** до резервуара **Load Samples** (Завантаження зразків). Уникайте контакту з покриттям із фольги.
- Після завантаження зразка перевіряйте наявність бульбашок повітря в резервуарі. Якщо бульбашки повітря присутні, обережно постукайте картриджем по столу, щоб вивільнити бульбашки.



Рисунок 2 Завантаження бібліотек



4. Перейдіть безпосередньо до етапів налаштування прогону, використовуючи інтерфейс системного програмного забезпечення MiSeq (MOS).

### Налаштування прогону

Усі інструкції з налаштування прогону див. у *Довідковому посібнику до приладу MiSeqDx із MOS, версія 2 (документ № 1000000021961)*.

1. Увійдіть до системи приладу MiSeqDx, скориставшись своїм паролем до програмного забезпечення диспетчера Local Run Manager.
2. На екрані Home (Головний екран) програмного забезпечення MOS виберіть **Sequence** (Послідовність).
3. Виберіть прогін зі списку й натисніть **Next** (Далі).  
Декілька екранів налаштування прогону відкриються в такому порядку: Load Flow Cell (Завантаження проточної кювети), Load Reagents (Завантаження реагентів), Review (Перегляд) і Pre-Run check (Перевірка перед прогоном).
4. Коли з'явиться екран Load Flow Cell (Завантаження проточної кювети), очистьте проточну кювету, а потім завантажте її.
5. Зачиніть фіксатор і дверцята відсіку проточної кювети.  
Перед початком прогону фіксатор і дверцята відсіку мають бути закритими. Після завантаження проточної кювети програма зчитує та записує RFID. У правому нижньому куті екрана з'явиться підтвердження успішного зчитування RFID.
6. Дотримуючись вказівок програмного забезпечення, завантажте пляшку з розчином SBS (PR2) для MiSeqDx, переконайтесь, що пляшка для відходів порожня, і завантажте картридж із реагентами. Після завантаження пляшки з розчином SBS (PR2) для MiSeqDx і картриджа з реагентами програма зчитує та записує RFID. У правому нижньому куті екрана з'явиться підтвердження успішного зчитування RFID.
7. Після початку прогону відкриється екран Sequencing (Секвенування). На цьому екрані ви побачите візуальне представлення виконання прогону, включно з даними про інтенсивність і показники оцінки якості (Q-показники).

## Результати

Програмне забезпечення для аналізу в режимі реального часу Real-Time Analysis (RTA) — це інтегроване програмне забезпечення, яке виконує аналіз зображень і розпізнавання основ, а потім присвоює оцінку якості до кожної основи для кожного циклу секвенування. Після завершення первинного аналізу модуль приладу MiSeqDx, вибраний у *Створення прогону за допомогою диспетчера Local Run Manager* на стор. 6, почне вторинний аналіз, описаний у цьому документі.

## Демультіплексування

Під час демультіплексування виконується порівняння кожної послідовності зчитування індексу з послідовностями індексів, заданими для кожного прогону. На цьому етапі якісні значення не враховуються.

Зчитування індексів ідентифікуються під час описаних далі етапів.

- Зразки нумеруються від 1 залежно від порядку, у якому їх перелічено для прогону.
- Номер зразка 0 резервується для кластерів, які не було присвоєно зразку.
- Кластери присвоюються зразку в разі точної відповідності послідовності індексів або коли є одна розбіжність на зчитування індексу.

## Генерування файлів FASTQ

Після демультіплексування програмне забезпечення генерує проміжні файли аналізу в форматі FASTQ, який є текстовим форматом для представлення послідовностей. Файли FASTQ містять зчитування для кожного зразка та пов'язані оцінки якості. Будь-який контроль, що використовується для прогону, і кластери, які не відповідають критеріям фільтру, виключено.

Кожний файл FASTQ містить зчитування лише для одного зразка, а ім'я цього зразка включається в ім'я файлу FASTQ. У робочому процесі модуля Somatic Variant (Соматичний варіант) генерується чотири файли FASTQ на зразок (два на олігонуклеотидний пул), два зі зчитування 1 і два зі зчитування 2. Файли FASTQ є первинними вхідними даними для вирівнювання.

## Вирівнювання

Під час етапу вирівнювання попарний алгоритм Сміта — Уотермана вирівнює кластери з одного зразка відносно послідовностей ампліконів, заданих у файлі маніфесту.

Попарний алгоритм Сміта — Уотермана здійснює напівглобальне вирівнювання послідовностей для визначення подібних областей у двох послідовностях. Замість порівняння всієї послідовності алгоритм Сміта — Уотермана порівнює сегменти всіх можливих довжин.

Кожне зчитування парних кінців оцінюється з точки зору його вирівнювання відносно відповідних послідовностей зондів для цього зчитування.

- Зчитування 1 оцінюється відносно зворотно комплементарної ділянки низхідного локус-специфічного олігонуклеотиду (Downstream Locus-Specific Oligo, DLSO).
- Зчитування 2 оцінюється відносно висхідного локус-специфічного олігонуклеотиду (Upstream Locus-Specific Oligo, ULSO).
- Якщо початок зчитування збігається з послідовністю зонду не більше ніж із трьома відмінностями (розбіжності або зсуви через переважання інделів), повна довжина зчитування вирівнюється відносно мішені амплікона для цієї послідовності.
- Індели для DLSO й ULSO не спостерігалися з огляду на хімічні властивості аналізу.

Результати вирівнювання записуються у файли вирівнювання (файли BAM). Зчитування фільтруються з результатів вирівнювання на підставі частоти розбіжності для області інтересу або повного амплікона, залежно від довжини амплікона. Відфільтровані зчитування записуються у файли вирівнювання, але позначаються як невірні та не використовуються в розпізнаванні варіантів.

## Розпізнавання варіантів

Механізм розпізнавання варіантів (Pisces) призначено для здійснення розпізнавань SNV, MNV й інделів із бібліотек, приготовлених для приладу.

## Звіти й додаткові вихідні файли

Модулі аналізу варіантів створюють звіти у форматі PDF і текстових файлів із поділом табуляцією (\*.txt), у яких відображаються показники на кшталт довжини секвенування й підрахунку варіантів. Крім того, модулі генерують вихідні файли, наприклад файли VCF або файли розпізнавання геномних варіантів (gVCF).

## Процедури контролю якості

Програмне забезпечення MiSeqDx оцінює кожний прогін, зразок і розпізнавання основ за показниками контролю якості. Позитивний і негативний контролю, включені в приготування бібліотеки, також необхідно оцінювати. Оцінювати результати контролю секвенування для контролю потрібно, як описано далі.

- Якщо контроль без додавання матриці генерує частоту розпізнавання > 10 %, тоді можливе виникнення помилки у відстеженні зразків, неправильне записування праймерів індексування або забруднення в контролі без додавання матриці. Протокол вважається не виконаним, і його потрібно повторити повністю, починаючи з приготування бібліотеки.
- Позитивний контрольний зразок має генерувати прогнозований результат. Якщо позитивний контроль генерує результат, відмінний від прогнозованого, можливо, має місце помилка у відстеженні зразка або неправильне записування праймерів індексування. Протокол потрібно повторити повністю, починаючи з приготування бібліотеки.

## Технічні характеристики

У дослідженнях генів зародкової лінії для приготування бібліотек використовувався 139-варіантний аналіз на муковісцидоз MiSeqDx або реагенти спеціального набору ампліконів TruSeq Dx. У двох наборах застосовуються ідентичні реагенти для приготування бібліотек, і вони мають лише одну відмінність із точки зору робочого процесу: кількість циклів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) — 25 і 28 відповідно. Додаткові цикли ПЛР дають змогу досягти меншого введення ДНК для спеціального набору ампліконів TruSeq Dx (50 нг) порівняно зі 139-варіантним аналізом на муковісцидоз MiSeqDx (250 нг), що продемонстровано в дослідженні введення ДНК за допомогою спеціального набору ампліконів TruSeq Dx. Бібліотеки, приготовлені із застосуванням 139-варіантного аналізу на муковісцидоз MiSeqDx, було секвеновано за допомогою супровідних реагентів для секвенування в наборі. Бібліотеки, приготовлені із застосуванням спеціального набору ампліконів TruSeq Dx, було секвеновано за допомогою набору реагентів MiSeqDx, версія 3. Останні реагенти для секвенування збільшили введення порівняно зі 139-варіантним аналізом на муковісцидоз MiSeqDx.

У дослідженнях соматичних генів застосовано спеціальний набір ампліконів TruSeq Dx із набором реагентів MiSeqDx, версія 3.

Усі дослідження проведено на приладі MiSeqDx. Було застосовано відповідні робочі процеси для генів зародкової лінії або соматичних генів, описані для спеціального набору ампліконів TruSeq Dx для приготування бібліотек для секвенування, з подальшим аналізом за допомогою модуля Germline Variant (Варіант зародкової лінії) або Somatic Variant (Соматичний варіант), за двома винятками. У дослідженнях із використанням одного гена (варіант зародкової лінії; 139-варіантний аналіз на муковісцидоз MiSeqDx) або двох генів (соматичний варіант) було застосовано залежні від аналізу робочі процеси й модулі аналізу як репрезентативні панелі мутацій.

Нотатка: геномний вміст амплікона підсумовано для геномної нитки, що секвенується. Що стосується ампліконів, сконструйованих на мінус-нитці, то вміст референсного геному є зворотно комплементарним (наприклад, області полі-А на ампліконах мінус-нитки відповідають областям полі-Т на еталонному геномі).

### Визначення обчислень, використаних у технічних характеристиках

- 1 Показник збігу позитивних результатів (PPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як варіанти за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
  - (Кількість локусів варіантів, правильно зареєстрованих у процесі аналізу) / (загальна кількість локусів варіантів)

Локуси варіантів, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-позитивними (ІП). Локуси варіантів, зареєстровані як референсні розпізнавання або як інші розпізнавання варіантів у процесі аналізу, є хибно-негативними (ХН)

- 2 Показник збігу негативних результатів (NPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як дикий тип за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
  - $(\text{Кількість локусів дикого типу, правильно зареєстрованих у процесі аналізу}) / (\text{загальна кількість локусів дикого типу})$   
Локуси дикого типу, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-негативними (ІН). Локуси дикого типу, зареєстровані в процесі аналізу як варіанти, є хибно-позитивними (ХП).
- 3 Відсоток загальної узгодженості (OPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, які правильно зареєстровано в процесі аналізу відносно еталонного методу.
  - $((\text{Кількість локусів варіантів, відображених аналізом}) + (\text{кількість локусів дикого типу, відображених аналізом})) / ((\text{загальна кількість локусів варіантів}) + (\text{загальна кількість локусів дикого типу}))$
- 4 Обчислення параметрів PPA, NPA і OPA не включає нерозпізнавання (варіантні або референсні локуси, які не відповідають одному чи декільком фільтрам якості). Зокрема, у двох дослідженнях нерозпізнавання було включено в показник «% правильних розпізнавань», і це включення позначено для застосованих таблиць.
- 5 Частота розпізнавання обчислюється як загальна кількість локусів, які пройшли фільтр, поділена на загальну кількість позицій, секвенованих для хромосом 1–22. Хромосоми X і Y виключаються. Цей показник не враховує узгодженість розпізнавань з еталонним методом.

Щодо робочих показників, пов'язаних із преаналітичними факторами (наприклад, методами екстракції або введенням ДНК), дивіться інструкцію з використання відповідного методу приготування бібліотеки.

### Індексація зразків

Праймери індексу зразків, додані під час підготовки бібліотеки, присвоюють унікальну послідовність до кожного зразка ДНК, що дає змогу об'єднувати декілька зразків в одному прогоні секвенування. Індексація зразків використовується в робочому процесі як для генів зародкової лінії, так і для соматичних генів.

Загалом 96 індексів зразків було протестовано за допомогою репрезентативного аналізу, призначеного для пошуку низки генів, які покривають 12 588 основ на нитку в усіх 23 хромосомах людини, для перевірки здатності аналізу стабільно виконувати розпізнавання під час генотипування заданого зразка в різних комбінаціях праймерів індексування. Y-хромосома не містить довірчих областей і не оцінювалась. Вісім унікальних зразків було протестовано з 12 різними комбінаціями праймерів індексування на зразок. Результати зразків із модуля аналізу генів зародкової лінії було порівняно з результатами зразків Platinum Genomes версії 2016-01. PPA (SNV та індели) перевищив 97 % (істинно-позитивні розпізнавання становили щонайменше 70 для SNV, 38 для інсерцій, 36 для делецій), а NPA становив 100 % (щонайменше 23 440 референсних позицій на комбінацію індексів) для кожної з 96 комбінацій індексів. Один індекс було окремо протестовано, щоб переконатися, що хімічна реакція секвенування за допомогою набору реагентів MiSeqDx, версія 3, може підтримувати менше 8 зразків (попередня хімічна реакція універсального набору MiSeqDx 1.0 обмежувалася мінімальною кількістю 8 зразків). Один індекс мав значення PPA 98,9 % (180/182) для SNV, 100 % (38/38) для інсерцій і 100 % (46/46) для делецій. NPA становив 100 % (23 856/23 856).

Дванадцять повторностей (24 бібліотеки) зразка було протестовано для вимірювання точності індексу із соматичними варіантами з частотою від 0,05 до 0,1 за допомогою модуля соматичних варіантів (для розпізнавання соматичних варіантів використовувалося по 2 комбінації індексів на повторність). PPA становив 100 % для SNV (64/64), інсерцій (11/11) і делецій (19/19). NPA становив 100 % (принаймні 11 590 референсних позицій на комбінацію індексів) для всіх комбінацій індексів.

## Перенесення зразків

Робочий процес приладу MiSeqDx включає підготовку бібліотеки й секвенування декількох зразків і контролю, які обробляються разом одночасно. Дослідження перенесення проводилося, щоб перевірити, чи впливають на результати тестування хибно-позитивні результати, отримані внаслідок перенесення від лунки до лунки під час підготовки бібліотеки зразків, а також у разі забруднення між послідовними прогонами секвенування. Було використано соматичні варіанти, тому що їх можна виявити з нижчою частотою алелей, ніж варіанти генів зародкової лінії.

Зразки склалися з чотирьох зразків геномної ДНК з клітинних ліній, для кожного з яких було виявлено різні панельні мутації під час двогенного репрезентативного аналізу. Зразки було підібрано так, що мутація в певній позиції одного гена характеризувалася наявністю референсної послідовності (дикого типу) в інших.

Перенесення з лунки до лунки визначається як помилка, яка потенційно виникає під час обробки вручну (піпетування, змішування зразків тощо). Для оцінки перенесення з однієї лунки зі зразком до іншої було виконано два тестових прогони.

- Розташування шаховим порядком зразка геномної ДНК (гДНК) високого вхідного рівня, який містить мутацію в гені 1, з чергуванням зі зразком гДНК низького вхідного рівня з мутацією в гені 2.
- Розташування шаховим порядком зразка гДНК високого вхідного рівня, який містить мутацію в гені 2, з чергуванням зі зразком гДНК низького вхідного рівня з мутацією в гені 1.

У кожному прогоні 12 повторностей оцінювалися на хибно-позитивні результати (наприклад, мутацію гена 1 виявлено в лунці, позначеній як зразок із мутацією в гені 2, і навпаки).

Перенесення між прогонами визначається як помилка, яка потенційно виникає через залишки від попереднього прогону секвенування. Щоб визначити, чи відбувається перенесення між прогонами секвенування, два планшети з 11 повторностями одного унікального зразка гДНК високого вхідного рівня, а також холосту пробу було підготовлено й секвеновано послідовно на одному приладі MiSeqDx, після чого було проведено оцінку на хибно-позитивні результати. У першому прогоні було 11 повторностей зразка з мутацією в гені 2 й одна холоста проба. У другому прогоні було 11 повторностей зразка з мутацією в гені 1 і одна холоста проба. Бібліотека зразка з мутацією в гені 2 було секвеновано першою, після чого виконувався прогін секвенування бібліотеки зразка з мутацією в гені 1, а потім ще один повторний прогін секвенування бібліотеки зразка з мутацією в гені 2. Якщо мутації гена 2 спостерігаються в прогоні з мутацією гена 1 і навпаки, це вказує на наявність перенесення.

Виявлено нуль хибно-позитивних результатів (0/24, 0 %) через перенесення з лунки до лунки. Були виявлені всі прогнозовані мутації. Виявлено нуль хибно-позитивних результатів (0/24, 0 %) через перенесення між прогонами. Було виявлено всі прогнозовані мутації. Виявлено нуль хибно-позитивних результатів (0/48, 0 %) через перенесення (з лунки до лунки та між прогонами).

## Технічні характеристики зародкової лінії

В описаних у цьому документі дослідженнях для аналізу даних секвенування було використано модуль для варіантів зародкової лінії за винятком тих досліджень із застосуванням одногенної панелі, де використовувався специфічний для аналізу модуль.

## Точність

Описане дослідження було проведено для оцінки точності приладу MiSeqDx із набором реагентів MiSeqDx, версія 3, і високоякісною ДНК. У дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку низки генів, які покривають 12 588 основ для 23 різних хромосом із використанням 150 ампліконів. Y-хромосома не містить довірчих областей і не оцінювалась. 12 унікальних зразків, використаних у цьому дослідженні, було отримано від однієї родини — двох батьків і 10 дітей. У таких випадках секвенування часто виконується численними лабораторіями із застосуванням різних методів. П'ять зразків отримано від жінок і сім — від чоловіків. Кожен зі зразків було протестовано у двох повторностях. Точність було визначено для SNV, інсерцій і делецій за допомогою порівняння даних дослідження з точно охарактеризованою референсною базою даних. Послідовність референсної бази даних (Platinum Genomes, версія 2016-01) було виведено з комбінації декількох методів секвенування, загальнодоступних даних і спадкової інформації. Довірчі геномні області було визначено на основі цього еталонного методу, якщо не зазначено інше. У підсумку прогін зразків здійснено 8 разів, і представлено таблиці, які демонструють точність на підставі даних із першого прогону.

У таблиці 1 містяться дані, представлені з відсотками збігу позитивних і негативних результатів залежно від зразка, де результати варіантів порівняно з точно охарактеризованим складеним еталонним методом для обчислення PPA. Поєднано три типи варіантів (SNV, інсерції та делеції). Еталонний метод дає результати лише для однонуклеотидних варіантів та інсерцій/делецій, тому для обчислення NPA результати розпізнавання основ, які не належать до варіантів, порівнюються зі збіркою референсної послідовності геному людини hg19.

**Таблиця 1** Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	Середня частота розпізнавань	Загалом варіантів	Загалом ІП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом нерозпізнавань	Загалом ІН-розпізнавань	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

Репрезентативний аналіз складався зі 150 ампліконів, які покривали різноманітний геномний матеріал. Уміст GC в ампліконах варіювався в межах 26–87 %. Також амплікони мали низку однонуклеотидних (наприклад, полі-А, полі-Т), динуклеотидних і тринуклеотидних повторів. Дані було скомпільовано за ампліконами (табл. 2) для визначення впливу геномного вмісту на % правильних розпізнавань. % правильних розпізнавань складається з розпізнавань варіантів і еталонних розпізнавань та становить менше 100 %, якщо є неправильні розпізнавання або випадки нерозпізнавання. Нерозпізнавання має місце, коли для визначення варіантів критерії одного чи декількох фільтрів не задовольняються (наприклад, у разі недостатнього покриття геному).

З восьми ХН варіантів із табл. 2 сім виникли з інсерцією 1 п. о. в ампліконі 111, який також містив гомополімер полі-А, а вміст GC становив 0,29. 1 ХН, що залишився (неправильне розпізнавання), виник через прогнозований гетерозиготний SNV в ампліконі 125 із вмістом GC 0,68, розпізнаний як гомозиготний варіант. Частота варіанта SNV становила 0,71, що було вище порогового значення 0,70 для класифікації в ролі гомозиготного варіанта. Амплікон із найнижчим % правильних розпізнавань (98,2 %) — це амплікон 17 із 40 нерозпізнаваннями, який містить повтори АТ і має вміст GC, що дорівнює 27 %.

Таблиця 2 Точність на рівні амплікона для приладу MiSeqDx

Амплі-кон	Хро-мосома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір про-аналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом прави-льних розпі-знавань	Загалом неправи-льних розпі-знавань	Загалом нерозпі-знавань	% прави-льних розпі-знавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-С (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА (3), індел	0,27	2112	0	0	100

8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Індел	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Полі-А (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Полі-Т (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ (3), індел	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ (3), індел	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Індел	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Полі-А (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Полі-Г (6), полі-Т (5), полі-А (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	1872	0	0	100



25	4	56236521	56236586	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Полі-А (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Полі-А (7), індел	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	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	Н/Д	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Полі-А (6), індел	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Полі-Т (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ (4), АG (3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Індел	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Полі-G (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Індел	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT (5), індел	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Полі-Т (5), TCT (3), CTT (3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Індел	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Полі-С (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Полі-G (5), індел	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Полі-А (5)	0,44	2184	0	0	100

43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Індел	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Полі-А (7), AG (4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Індел	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Полі-С (5), індел	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Полі-С (6), полі-С (6), індел	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Індел	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Полі-С (7), СТС (4), індел	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Індел	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Полі-С (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Індел	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ (3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Полі-С (5), індел	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	СС (3)	0,87	2184	0	0	100

61	10	27317777	27317855	79	79	Полі-Т (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Індел	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС (11), індел	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Індел	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Індел	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Полі-А (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Полі-С (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Індел	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Полі-А (5), СА (3), індел	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	СА (3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Полі-С (5), індел	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Полі-А (7), АС (4)	0,33	2232	0	0	100

80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Полі-А (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Полі-С (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Полі-А (5), полі-Т (7), полі-А (7), індел	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Індел	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Індел	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	Н/Д	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Полі-Т (5), індел	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Індел	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Індел	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Полі-А (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Індел	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Полі-С (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Індел	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Полі-С (5), індел	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Полі-Т (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Індел	0,65	1704	0	0	100

99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Індел	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Полі-С (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА (3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Полі-С (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Полі-Т (5), індел	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	Полі-С (5), індел	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Індел	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Індел	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Полі-Т (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Полі-А (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Полі-А (7), АТ (3), АТ (4), АТ (4), індел	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Індел	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	Полі-Т (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	Н/Д	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Полі-А (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС (3), індел	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ (3), індел	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС (3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ (3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	СТ (3), TG (4), індел	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Індел	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Індел	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Полі-С (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Індел	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Індел	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Полі-Т (6), СА (3)	0,54	2352	0	0	100

137	21	36710706	36710792	87	87	ГТ (3), індел	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Полі-А (6), АГ (3), індел	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	Полі-Т (5), полі-А (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Індел	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Індел	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Індел	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Полі-Т (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Полі-С (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Полі-А (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Варіанти, для яких було зафіксовано нерозпізнавання, підсумовані в табл. 3. Певні фільтри, які призвели до нерозпізнавань, перелічені в таблиці. Інсерцію в ампліконі 111 було відфільтровано для 9 із 16 випадків, при цьому решта сім випадків розпізнані як референсні, а тому є ХН.

Таблиця 3 Зведення варіантів, які не були розпізнані

№ амплікона	Хр:Поз	Варіант	Вміст відповідного амплікона	Фільтр	Відсутні варіанти	Прогнозовані варіанти	ХН розпізнавання
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	Полі-A (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: фільтр повторів. Варіант відфільтровується, якщо всі варіанти або частина повторно присутні в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта.

У референсному матеріалі має бути щонайменше 9 повторів, причому враховуються лише повтори довжиною не більше 5 п. о.

Результати секвенування для зразка NA12878 було порівняно з генотипом із високим ступенем вірогідності для NA12878, затвердженим Національними інститутами стандартів і технологій (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (в. 2.19). 92 зі 150 ампліконів були виявлені повністю в межах геномних областей із високим ступенем вірогідності, 41 амплікон мав часткове перекриття, і 17 ампліконів не мали перекриття в послідовності, затвердженій NIST. Це призвело до появи 10 000 координат на повторність для порівняння. Результати розпізнавання основ, які не належали до варіантів, було порівняно зі збіркою референсної послідовності геному людини 19. Результати дослідження точності наведені в табл. 4.

Таблиця 4 Узгодженість результатів розпізнавання основ на приладі MiSeqDx із базою даних NIST для зразка NA12878

Зразок	К-ть ампліконів	Середня частота розпізнавань	Загалом ІІ-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом ІН-розпізнавань	Загалом ХІІ-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100



Зразки було додатково проаналізовано для розпізнавання незначних інсерцій і делецій (інделів) (табл. 5). У деяких випадках індел був спільним для двох або більше зразків, що відображено в стовпчику таблиці «Загальна кількість повторностей зразків з інделами». Результати для обох повторностей 12 придатних зразків представлено в табл. 5. Загалом був 71 індел з розміром 1–24 п. о. для інсерцій і 1–25 п. о. для делецій. 69 інделів було виявлено з показником збігу позитивних результатів у 100 %. Одна делеція (амплікон 64, делеція 2 п. о. (chr10 55892600 TAC>T) не мала правильних розпізнавань, бо кожен із цих варіантів був нерозпізнаванням через фільтр R5x95). Тому не вдалось обчислити PPA, який виключає нерозпізнавання. Інший індел, інсерція 1 п. о. (chr17 39589692 C>CA в ампліконі 111, також не мав правильних розпізнавань, тому що 9 варіантів не було розпізнано через фільтр R5x9, а 7 були ХН-розпізнаваннями.

Таблиця 5 Зведення даних виявлення інделів за допомогою приладу MiSeqDx

Амплі-кон	Хро-мосома	Позиція	Розмір про-аналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпі-знавань	Загалом неправиль-них розпі-знавань інделу	Загалом правиль-них розпі-знавань інделу	PPA
1	1	36450544	93	Делеція 25 п. о.	GAAAATTTA ATGAAACACA TTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Делеція 3 п. о.	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Інсерція 23 п. о.	T>TTTTAATA GCAAAAAGA GGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Делеція 17 п. о.	GACAGACTGTG AGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Інсерція 5 п. о.	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Інсерція 3 п. о.	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Інсерція 7 п. о.	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100

9	2	87003972	80	Делеція 6 п. о.	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Інсерція 5 п. о.	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Інсерція 12 п. о.	C>CTGAAAA TAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Інсерція 2 п. о.	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Делеція 23 п. о.	ТААСТТАА ААТТАСААА АТААССС>Т	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Інсерція 9 п. о.	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Делеція 1 п. о.	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Делеція 8 п. о.	ТААССГААА>Т	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Інсерція 11 п. о.	T>TTATGGT ATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Делеція 4 п. о.	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Інсерція 8 п. о.	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Делеція 21 п. о.	CCCTGGGT GCTATAGC CCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Делеція 3 п. о.	GCTT>G	14	0	0	14	100

39	6	32986905	95	Делеція 25 п. о.	CTTTCACT TTCCCGTCT CATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Делеція 23 п. о.	GGCATGAG GCTTGGTGA CATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Інсерція 1 п. о.	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Делеція 4 п. о.	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Інсерція 1 п. о.	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Делеція 4 п. о.	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Делеція 11 п. о.	GAATCTG CACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Делеція 1 п. о.	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Інсерція 4 п. о.	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Інсерція 4 п. о.	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Делеція 21 п. о.	TCTGGGGG GCAGCCCC TGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Делеція 3 п. о.	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Делеція 16 п. о.	AGCGTCTAT AACCAAAT>A	12	0	0	12	100

64	10	55892600	89	Делеція 2 п. о.	TAC>T	10	10	0	0	Н/Д
68	11	30177690	70	Інсерція 2 п. о.	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Інсерція 8 п. о.	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Делеція 8 п. о.	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Делеція 2 п. о.	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Інсерція 21 п. о.	T>TTCTCAG TACGGTGA ACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Інсерція 19 п. о.	C>CAAAAT ATAAAAA GCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Інсерція 4 п. о.	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Делеція 20 п. о.	ATCTATTT TCTAATAG ACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Делеція 22 п. о.	TTTAAAAT TTGAATGTG ATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Інсерція 4 п. о.	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Делеція 16 п. о.	CTTGCT CTATAA ACCGT>C	10	0	0	10	100

93	14	102808554	94	Делеція 5 п. о.	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Делеція 6 п. о.	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Делеція 25 п. о.	GCCCCTGA GCCAGCCTC CCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Інсерція 3 п. о.	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Інсерція 4 п. о.	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Делеція 7 п. о.	ATTATTT>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Делеція 1 п. о.	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Інсерція 18 п. о.	A>ATCCTATTC TACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Інсерція 4 п. о.	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Інсерція 1 п. о.	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Інсерція 24 п. о.	T>TTCTGAA GGTCAAGTCT ATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Делеція 4 п. о.	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Делеція 12 п. о.	TTTGAT CTGCTG>T	20	0	0	20	100

120	18	38837054	75	Інсерція 22 п. о.	T>TGATCT TAGCAAAAG TTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Інсерція 3 п. о.	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Делеція 2 п. о.	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Делеція 15 п. о.	TACTTGAGAA CTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Інсерція 5 п. о.	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Інсерція 11 п. о.	G>GGAATG TCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Делеція 16 п. о.	TCCTGGCTG GCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Інсерція 11 п. о.	G>GATAAAA CTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Делеція 21 п. о.	ACTCAAGAT AAATCATGT TATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Делеція 5 п. о.	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Інсерція 6 п. о.	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Інсерція 5 п. о.	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Делеція 10 п. о.	GGGCACA GGCA>G	12	0	0	12	100

## Відтворюваність

Було проведено два дослідження для оцінки точності приладу MiSeqDx із клітинними лініями (дослідження 1 і 2) або збідненою лейкоцитами кров'ю, у яку було внесено певну кількість матеріалу клітинних ліній (дослідження 2). У дослідженні 1 використано декілька приладів. Друге дослідження проводилось у кількох дослідницьких центрах.

## Дослідження 1

Відтворюваність приладу MiSeqDx було визначено з використанням двох приладів і двох серій реагентів двома операторами в загальній кількості восьми прогонів. Репрезентативний аналіз, зразки й еталонний метод були аналогічними описаним у дослідженні точності.

Результати представлено за ампліконами для кожного приладу (табл. 6), щоб продемонструвати відтворюваність розпізнавання для приладів. % правильних розпізнавань включав як неправильні розпізнавання, так і нерозпізнавання (коли в разі розпізнавання варіантів критерії одного чи декількох фільтрів не задовольняються). Прилади згенерували подібну кількість нерозпізнавань і неправильних розпізнавань залежно від конкретного амплікона.

Таблиця 6 Результати дослідження відтворюваності між приладами для MiSeqDx (на рівні ампліконів)

Амплі-кон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-Г (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0

6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА (3), індел	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Індел	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	Полі-А (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	Полі-Т (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ (3), індел	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ (3), індел	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А (9), ТГ (3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0



21	3	190106030	190106104	75	74	Індел	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	Полі-А (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	Полі-С (6), полі-Т (5), полі-А (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	Полі-А (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	Полі-А (7), індел	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT (3), ССА (3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	Полі-А (6), індел	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	Полі-Т (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ (4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Індел	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	Полі-С (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Індел	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT (5), індел	0,61	8979	0	45	8979	0	45

38	6	32147987	32148084	98	98	Полі-Г (5), ТСТ (3), СТТ (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Індел	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	Полі-С (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	Полі-С (5), індел	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	Полі-А (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Індел	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	Полі-А (7), АГ (4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Індел	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	Полі-С (5), індел	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	Полі-С (6), полі-С (6), індел	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Індел	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	Полі-С (7), СТС (4), індел	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Індел	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	Полі-С (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Індел	0,32	6240	0	0	6240	0	0

56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ (3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	Полі-С (5), індел	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	СС (3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	Полі-Т (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Індел	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	АС (11), індел	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Індел	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Індел	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	Полі-А (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	Полі-С (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Індел	0,53	8160	0	0	8160	0	0

76	11	120357801	120357885	85	85	Полі-А (5), СА (3), індел	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	Полі-С (5), індел	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	Полі-А (7), АС (4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	Полі-А (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	Полі-С (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	Полі-А (5), полі-Т (7), полі-А (7), індел	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Індел	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Індел	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	Н/Д	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	Полі-Т (5), індел	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Індел	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Індел	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	Полі-А (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Індел	0,62	9024	0	0	9024	0	0

94	15	43170751	43170848	98	96	Полі-С (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Індел	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	Полі-С (5), індел	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	Полі-Т (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Індел	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Індел	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	Полі-С (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА (3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	Полі-С (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	Полі-Т (5), індел	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	С (3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	Полі-С (5), індел	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Індел	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Індел	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	Полі-Т (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	Полі-А (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0

113	17	45438866	45438957	92	92	Полі-А (7), АТ (3), АТ (4), АТ (4), індел	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Індел	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	Полі-Т (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	Н/Д	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	Полі-А (6), TG (3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС (3), індел	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ (3), індел	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	АС (3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ (3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT (3), TG (4), індел	0,46	6720	0	0	6720	0	0

131	20	25278421	25278521	101	101	Індел	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Індел	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	Полі-G (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Індел	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Індел	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	Полі-Г (6), СА (3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT (3), індел	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	Полі-А (6), AG (3), індел	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	Полі-Г (5), полі-А (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Індел	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Індел	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Індел	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	Полі-Г (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	Полі-С (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	Полі-А (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Результати дослідження відтворюваності було проаналізовано залежно від оператора з використанням частоти варіантів (табл. 7). Цей аналіз продемонстрував, що частоти варіантів збігались у всіх операторів. Представлені середні частоти варіантів  $\pm 1$  стандартне відхилення.

Таблиця 7 Залежні від оператора результати для приладу MiSeqDx

Діапазон частот варіантів	К-ть унікальних варіантів	Загальна к-ть варіантів, проаналізована оператором 1	Загальна к-ть варіантів, проаналізована оператором 2	Середня (СВ) зареєстрована частота варіанта, оператор 1	Середня (СВ) зареєстрована частота варіанта, оператор 2
Гомозиготні(0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 $\pm$ 0,07	0,96 $\pm$ 0,05
Гетерозиготні (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04

Результати дослідження відтворюваності для кожного зразка наведено сумарно для всіх восьми прогонів (табл. 8). Виявлення оцінюється для кожного типу варіанта — SNV, інсерції й делеції окремо. Референсні позиції виключено. Цей аналіз продемонстрував, що результати для варіантів були відтворюваними для всіх зразків.

Таблиця 8 Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	SNV				Інсерції				Делеції			
	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН
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

Дані, отримані після 8 прогонів у цьому дослідженні відтворюваності, підтверджують гіпотезу, що прилад MiSeqDx може стабільно секвенувати:

- Уміст GC  $\geq 19$  % (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів з умістом GC 19 % розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 1,1 %)
- Уміст GC  $\leq 78$  % (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів з умістом GC 78 % розпізнано правильно без нерозпізнавань)



- Фрагменти полі-А довжиною  $\leq 8$  (повтор полі-А з 8 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-А в кількості 8)
- Фрагменти полі-Т довжиною  $\leq 10$  (повтор полі-Т з 10 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-Т в кількості 10)
- Фрагменти полі-Г довжиною  $\leq 7$  (повтор полі-Г із 7 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-Г в кількості 7)
- Фрагменти полі-С довжиною  $\leq 6$  (повтор полі-С із 6 нуклеотидів розпізнано правильно для 576 з 576 секвенованих ампліконів, які містять полі-С в кількості 6)
- Довжини динуклеотидних повторів  $\leq 11x$  (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів із динуклеотидним повтором 11x були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,5 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів  $\leq 5x$  (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів із тринуклеотидним повтором 5x були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,5 %)
- Інсерції основ у кількості не більше 24 або делеції основ у кількості не більше 25
  - 24-основні інсерції розпізнано правильно в 192 зі 192 зразків
  - 25-основні делеції розпізнано правильно в 223 зразках і неправильно в 1 зразку з 224

## Дослідження 2

Дослідження відтворюваності між центрами, проведене з репрезентативним 139-варіантним аналізом на муковісцидоз Illumina MiSeqDx, включало підмножину клінічно значущих генетичних варіацій *CFTR*, проаналізованих за допомогою програмного забезпечення MiSeq Reporter із використанням робочого процесу цільового секвенування ДНК MiSeqDx (табл. 9). У сліпому дослідженні брало участь 3 дослідницьких центри, по 2 оператори від кожного центру. Кожний оператор кожного центру провів тестування двох точно охарактеризованих панелей із 46 зразків у загальному обсязі 810 розпізнавань на центр. Панелі містили суміш геномної ДНК з клітинних ліній із відомими варіантами в гені *CFTR*, а також збіднену лейкоцитами кров, у яку було внесено певну кількість матеріалу клітинних ліній із відомими варіантами в гені *CFTR*. Зразки крові було надано для включення етапів екстракції, які використовуються для підготовки гДНК, що є первинним уведенням для робочого процесу аналізу. Показник проходження контролю зразками, що визначається за кількістю зразків, які пройшли контроль якості з першої спроби, становив 99,88 %. Усі результати тестів базуються на початковому тестуванні.

Таблиця 9 Зведення результатів дослідження відтворюваності, проведеного з репрезентативним 139-варіантним аналізом на муковісцидоз MiSeqDx

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/ 2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/ R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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 <sup>3</sup>	F508del/ W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/ 3272- 26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/ 3849+10 kbC>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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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 відсутні	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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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	Н/Д	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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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	Н/Д	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	Н/Д	100	100
A	39	F508del/3849+10kb C>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T /3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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	Н/Д	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	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	Н/Д	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	Н/Д	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100



Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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 (с.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	Н/Д	100	100
B	71	E92X/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/ 1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	83	R117H/ F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789 +5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/ 1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	89	F508del/ 2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Загалом				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Розташування гена дикого типу, який відповідає варіанту N1303K для однієї з повторностей, призвело до нерозпізнавання через недостатнє покриття.

<sup>2</sup> Одна з повторностей для зразків 5 і 75 характеризувалася показником розпізнавання 0 %. Подальше розслідування випадку вказує на те, що зразки, можливо, не додавалися на планшет для зразків перед підготовкою бібліотеки, бо об'єм зразків, що залишився в пробірках, не змінився порівняно з вихідним.

<sup>3</sup> Є свідчення про те, що оператор, імовірно, поміняв зразки 9 і 10 перед підготовкою бібліотеки.

<sup>4</sup> Розташування гена дикого типу, який відповідає варіанту M1V для однієї повторності кожного з двох зразків, призвело до нерозпізнавання через недостатнє покриття.

### Технічні характеристики соматичної лінії

В описаних у цьому документі дослідженнях для аналізу даних секвенування було використано модуль для соматичних варіантів за винятком тих досліджень із застосуванням двогенної панелі, де використовувався специфічний для аналізу модуль.

### Точність

Для оцінки роботи приладу MiSeqDx з ДНК, екстрагованими зі зразків FFPE, було проведено три дослідження.

## Дослідження 1

У дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку низки генів, які покривають 12 588 основ для 23 різних хромосом із використанням 150 ампліконів. Y-хромосома не містить довірчих областей і не оцінювалась. П'ять унікальних зразків, використаних у цьому дослідженні, було отримано від однієї родини — двох батьків і трьох дітей. У таких випадках секвенування часто виконується численними лабораторіями із застосуванням різних методів. Три зразки отримано від жінок і два — від чоловіків. Перш ніж екстрагувати ДНК для дослідження, усі зразки було зафіксовано у формаліні й залито парафіном. Зразок GM12877 було розведено на рівні ДНК зразком GM12878 для створення GM12877-D, щоб отримати набір варіантів із частотами приблизно 5 % і 10 %. Кожен зі зразків було протестовано у двох повторностях, окрім GM12877-D, який було протестовано в п'яти повторностях. Точність було визначено для SNV, інсерцій та делецій за допомогою порівняння даних дослідження з точно охарактеризованою референсною базою даних. Послідовність референсної бази даних (Platinum Genomes, версія 2016-01) було виведено з комбінації декількох методів секвенування, загальнодоступних даних і спадкової інформації. Довірчі геномні області було визначено виходячи з цього еталонного методу, якщо не зазначено інше. У підсумку прогін зразків здійснено вісім разів, і представлено таблиці, які демонструють точність на підставі даних із першого прогону.

У таблиці 10 містяться дані, представлені з відсотками збігу позитивних і негативних результатів залежно від зразка, де результати варіантів порівняні з точно охарактеризованим складеним еталонним методом для обчислення PPA. Поєднано три типи варіантів (SNV, інсерції та делеції). Оскільки еталонний метод дає результати лише для однонуклеотидних варіантів та інсерцій/делецій, для обчислення NPA результати розпізнавання основ, які не належать до варіантів, порівнюються зі збіркою референсної послідовності геному людини hg19.

**Таблиця 10** Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx із референсними даними для 6 точно охарактеризованих зразків

Зразок	Середня частота розпізнавань	Загалом варіантів	Загалом ІІ-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом ІІ-розпізнавань	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 <sup>1</sup>	98,4	675	650	0	57608	100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>		155	155	0		100	100	100

<sup>1</sup> Варіанти з частотою більше 20 %.

<sup>2</sup> Варіанти з частотою менше 20 %.

150 ампліконів було розроблено з метою покриття різноманітного геномного матеріалу. Уміст GC в ампліконах варіювався в межах 26–87 %. Також амплікони мали низку однонуклеотидних (наприклад, полі-А, полі-Т), динуклеотидних і тринуклеотидних повторів. В аналізі було використано 6 унікальних зразків. Дані було скомпільовано за ампліконом (табл. 11) для визначення впливу геномного вмісту на % правильних розпізнавань. % правильних розпізнавань складається з розпізнавань варіантів і референсних розпізнавань та становить менше 100 %, якщо є неправильні розпізнавання або випадки нерозпізнавання. Нерозпізнавання має місце, коли для визначення варіантів критерії одного чи декількох фільтрів не задовольняються (наприклад, у разі недостатнього покриття геному). Неправильних розпізнавань не спостерігалось. Кількість нерозпізнавань значно варіювалася поміж ампліконів. Вміст GC та множинні випадки взаємодії з умістом GC були найбільш значущими прогностичними факторами нерозпізнавання. 2040 із 2580 (79 %) випадків нерозпізнавання виникли через недотримання вимог до покриття геному. Більшість випадків нерозпізнавання прийшла на амплікони з умістом GC більше 78 %. Для репрезентативного амплікона з умістом GC 78 % загалом було виявлено 675 випадків нерозпізнавання. Для репрезентативного амплікона з умістом GC 87 % загалом було виявлено 1365 випадків нерозпізнавання. Покриття геному можна збільшити завдяки скороченню кількості зразків, які завантажуються до проточної кювети, що дасть змогу виявляти амплікони з високим вмістом GC.

Таблиця 11 Дані точності на рівні амплікона

Амплі-кон	Хро-мосома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір про-аналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-С (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА (3), індел	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	1350	0	0	100

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

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



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

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

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

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

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

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

Варіанти, для яких було зафіксовано нерозпізнавання, підсумовано в табл. 12. Певні фільтри, які призвели до нерозпізнавань, перелічено в таблиці.

Таблиця 12 Зведення варіантів, які не розпізнано

№ амплікона	Хр:Поз	Варіант	Вміст відповідного амплікона	Фільтр	Відсутні варіанти	Прогнозовані варіанти
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP <sup>1</sup>		13
52	8:24811064	AG > A	Полі-G (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	Полі-GC (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	Полі-A (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP: низьке покриття геному. Варіант відфільтровується, якщо глибина секвенування щонайменше в одному з пулів у цій позиції становить нижче 900.

<sup>2</sup> R3x6: фільтр повтору. Варіант відфільтровується, якщо всі варіанти або частина повторно присутні в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. У референсному матеріалі має бути щонайменше п'ять повторів, причому враховуються лише повтори довжиною не більше 3 п. о.

Результати секвенування для зразка було порівняно з генотипом із високим ступенем вірогідності для NA12878, затвердженим Національними інститутами стандартів і технологій (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (в. 2.19). 92 зі 150 ампліконів було виявлено повністю в межах геномних областей із високим ступенем вірогідності, 41 амплікон мав часткове перекриття, і 17 ампліконів не мали перекриття в послідовності, затвердженій NIST. Це призвело до появи 10 000 координат на повторність для порівняння. Результати розпізнавання основ, які не належали до варіантів, було порівняно зі збіркою референсної послідовності геному людини hg19. Результати дослідження точності наведено в табл. 13.

**Таблиця 13** Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx із референсними матеріалами NIST для зразка GM12878

Зразок	К-ть ампліконів	Середня частота розпізнавань	Загалом ІІІ-варіантів розпізнавань	Загалом ХН-варіантів розпізнавань	Загалом ІН-розпізнавань	Загалом ХІІ-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100



П'ять нерозведених зразків було додатково проаналізовано для розпізнавання незначних інсерцій і делецій (інделів) (табл. 14). У деяких випадках індел був спільним для двох або більше зразків, що відображено в стовпчику таблиці «Загальна кількість повторностей зразків з інделами». Результати для обох повторностей п'яти придатних зразків представлено в таблиці 14. Загалом було виявлено 71 індел із розміром 1–24 п. о. для інсерцій і 1–25 п. о. для делецій. Кожен із 68 інделів було виявлено з показником збігу позитивних результатів, що дорівнював 1. Три інсерції та делеції не мали правильних розпізнавань, бо кожен із цих варіантів був нерозпізнаним через фільтр R3x6. Тому для них не вдалось обчислити PPA, який виключає нерозпізнавання. Три варіанти були делецією 1 п. о. (chr8 24811064 AG>A), делецією 2 п. о. (chr10 55892600 TAC>T) та інсерцією 1 п. о. (chr17 39589692 C>CA).

Таблиця 14 Зведення даних виявлення інделів за допомогою приладу MiSeqDx

Амплі-кон	Хро-мосома	Позиція	Розмір про-аналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть по-вторностей зразків з інделом	К-ть нерозпі-знавань	Загалом неправи-льних розпі-знавань інделу	Загалом прави-льних розпі-знавань інделу	PPA
1	1	36450544	93	Делеція 25 п. о.	GAAAATTTAA TGAAACACAT TGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Делеція 3 п. о.	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Інсерція 23 п. о.	T>TTTTAAT AGCAAAAAG AGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Делеція 17 п. о.	GACAGACTGTG AGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Інсерція 5 п. о.	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Інсерція 3 п. о.	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Інсерція 7 п. о.	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100

9	2	87003972	80	Делеція 6 п. о.	TTATCT>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Інсерція 5 п. о.	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Інсерція 12 п. о.	C>CTGAAA ATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Інсерція 2 п. о.	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Делеція 23 п. о.	ТААСТТААА АТТАСААААТ ААССС>Т	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Інсерція 9 п. о.	C>CCTGG CTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Делеція 1 п. о.	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Делеція 8 п. о.	ТААСССГААА>Т	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Інсерція 11 п. о.	T>TTATGG TATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Делеція 4 п. о.	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Інсерція 8 п. о.	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Делеція 21 п. о.	CCCTGGGTG СТАТАGCC САССА>С	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Делеція 3 п. о.	GCTT>G	15	0	0	15	100

39	6	32986905	95	Делеція 25 п. о.	CTTCACT TCCCCGTCT CATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Делеція 23 п. о.	GGCATGA GGCTTGGTG ACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Інсерція 1 п. о.	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Делеція 4 п. о.	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Інсерція 1 п. о.	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Делеція 4 п. о.	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Делеція 11 п. о.	GAATCTG CACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Делеція 1 п. о.	AG>A	15	15	0	0	Н/Д
53	8	76518677	67	Інсерція 4 п. о.	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Інсерція 4 п. о.	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Делеція 21 п. о.	TCTGGGGG GCAGCCCC TGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Делеція 3 п. о.	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Делеція 16 п. о.	AGCGTCT ATAACCA AAT>A	11	0	0	11	100

64	10	55892600	89	Делеція 2 п. о.	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Інсерція 2 п. о.	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Інсерція 8 п. о.	T>TTAT GAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Делеція 8 п. о.	CAGTG TGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Делеція 2 п. о.	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Інсерція 21 п. о.	T>TTCTCA GTACGGTG AACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Інсерція 19 п. о.	C>CAAAA TATAAAA AGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Інсерція 4 п. о.	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Делеція 20 п. о.	ATCTATTT TCTAATAG ACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Делеція 22 п. о.	TTTAAAAT TTGAATGT GATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Інсерція 4 п. о.	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Делеція 16 п. о.	CTTGCTC TATAAAC CGT>C	11	0	0	11	100

93	14	102808554	94	Делеція 5 п. о.	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Делеція 6 п. о.	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Делеція 25 п. о.	GCCCCTGAG CCAGCCTCC CGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Інсерція 3 п. о.	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Інсерція 4 п. о.	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Делеція 7 п. о.	ATTATTT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Делеція 1 п. о.	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Інсерція 18 п. о.	A>ATCCTA TTCTACTC TGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Інсерція 4 п. о.	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Інсерція 1 п. о.	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Інсерція 24 п. о.	T>TTCTGAA GGTCAAGTC TATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Делеція 4 п. о.	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Делеція 12 п. о.	TTTGAT CTGCTG>T	13	0	0	13	100

120	18	38837054	75	Інсерція 22 п. о.	T>TGATCT TAGCAAAAG TTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Інсерція 3 п. о.	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Делеція 2 п. о.	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Делеція 15 п. о.	TACTTGAGA ACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Інсерція 5 п. о.	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Інсерція 11 п. о.	G>GGAAT GTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Делеція 16 п. о.	TCCTGGC TGGCCTG TGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Інсерція 11 п. о.	G>GATAA AACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Делеція 21 п. о.	ACTCAAGA TAACTCATG TTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Делеція 5 п. о.	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Інсерція 6 п. о.	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Інсерція 5 п. о.	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Делеція 10 п. о.	GGGCAC AGGCA>G	7	0	0	7	100

## Дослідження 2

У цьому дослідженні використовуються зафіксовані формаліном і залиті парафіном (FFPE) зразки тканини колоректального раку з банку тканин і репрезентативний 2-генний аналіз, який було порівняно з еталонним методом — двонапрямним секвенуванням Сенгера (Сенгер). З 1183 пацієнтів загалом придатними виявилися результати досліджень за методом Сенгера та репрезентативним аналізом у 441 пацієнта. Під час оцінювання на рівні пацієнтів (табл. 15) результати 230 пацієнтів із 441 були позитивними за методом Сенгера (мутації, виявлені за Сенгером), і з них 227 були позитивними за репрезентативним аналізом. У решти 211 пацієнтів із 441 результати були негативними за Сенгером (мутацій за методом Сенгера не виявлено), і з них 206 були негативними за репрезентативним аналізом. Обчислений показник збігу позитивних результатів у відсотках (Positive Percent Agreement, PPA) становив 98,7 %, а показник збігу негативних результатів (Negative Percent Agreement, NPA) — 97,6 % (табл. 15).

**Таблиця 15** Відсоток збігу позитивних і негативних результатів на рівні пацієнтів

Репрезентативний аналіз	Сенгер		Загалом
	Позитивні	Негативні	
Позитивні	227 <sup>1</sup>	5	232
Негативні	3 <sup>2</sup>	206	209
Загалом	230	211	441

### Зведені показники

Статистика збігів	Точкова оцінка	Точний ДІ 95 %
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

<sup>1</sup> Спостерігалось 224 точних збіги для результатів в одного пацієнта на рівні всіх мутацій. У 2 пацієнтів MiSeqDx виявив мутацію, попередньо діагностовану за Сенгером, і 1 додаткову мутацію. В 1 пацієнта MiSeqDx і метод Сенгера виявили різні мутації.

<sup>2</sup> В одного пацієнта 2 мутації було виявлено за Сенгером. У 2 пацієнтів за методом Сенгера було виявлено одну мутацію.

## Дослідження 3

У цьому дослідженні оцінюються бібліотеки ДНК, приготовлені зі зразків FFPE з різних типів тканин. Загалом використано 109 зразків FFPE з восьми різних тканин (товста кишка, яєчник, підшлункова залоза, надниркова залоза, сечовий міхур, печінка, щитоподібна залоза та молочна залоза), причому кожний тип тканини представлено не менше ніж 11 зразками FFPE. Тканина надниркових залоз включала метастази з пухлин стравоходу, легень, товстої кишки, а інші зразки тканини було взято з первинних пухлин. У цьому дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку 26 генів, які покривають 21 577 основ для 17 різних хромосом. Загалом 6 різних генів (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* і *BRAF*) було секвеновано за методом Сенгера для кожної пухлини, де 1–3 гени було секвеновано за методом Сенгера на підставі прогнозованого переважання соматичних мутацій для цієї

пухлини. У результаті секвенування Сенгера було ідентифіковано 39 соматичних мутацій SNV у 33 зі 109 зразків FFPE. Прилад MiSeqDx ідентифікував 36 соматичних мутацій SNV у 32 зі 109 зразків FFPE з 1 хибно-негативним результатом і 2 нерозпізнаннями позицій варіантів. PPA становив 97,3 %. Прилад MiSeqDx ідентифікував 78 975 референсних основ для 109 зразків FFPE з 29 хибно-позитивними результатами відносно секвенування Сенгера й 2437 нерозпізнаннями. NPA становив 99,9 %. Делеція двох основ виявилась узгодженою між двома методами. У таблиці 16 підсумовано результати за типом тканини.

Таблиця 16 Відсоток збігу позитивних і негативних результатів за типом тканини

Тип тканини	Кількість зразків	Загалом варіантів	Загалом ПП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом ІН-розпізнавань	Загалом ХП-розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	PPA	NPA
Надниркова залоза	16	6	4	1	11823	2	607	80	> 99,9
Сечовий міхур	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Молочна залоза	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Товста кишка	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Печінка	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Яечник	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Підшлункова залоза	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Щитоподібна залоза	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Загалом	109	39	36	1	78974	29	3416	97,3	> 99,9

### Відтворюваність

Для оцінки відтворюваності приладу MiSeqDx з ДНК, екстрагованими зі зразків FFPE, було проведено два дослідження. У дослідженні 1 використано декілька приладів, а дослідження 2 проводилось у декількох дослідницьких центрах.

### Дослідження 1

Відтворюваність приладу MiSeqDx було визначено з використанням двох приладів двома підготовленими операторами в загальній кількості восьми прогонів. Репрезентативний аналіз, геномний контекст ампліконів, зразки й еталонний метод були аналогічними описаним у дослідженні точності 1 вище. Результати представлені за ампліконами для кожного приладу (табл. 17), щоб продемонструвати відтворюваність розпізнавання для приладів. %



правильних розпізнавань включав як неправильні розпізнавання, так і нерозпізнавання (коли під час розпізнавання варіантів критерії одного чи декількох фільтрів не задовольняються). Прилади згенерували подібну кількість нерозпізнавань залежно від конкретного амплікона. Одне неправильне розпізнавання в довірчій області, визначеній за референсним стандартом Platinum Genomes, спостерігалось для MiSeqDx 1. Неправильне розпізнавання було хибно-позитивним розпізнаванням варіанта інсерції в ампліконі 64 шуканої послідовності генів у хромосомі 10 у позиціях від 55892599 до 55892687. Амплікон містив динуклеотидний повтор 11.

Таблиця 17 Результати дослідження відтворюваності між приладами для MiSeqDx (на рівні ампліконів)

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	M70215			M70217		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
1	1	93	93	Індел	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Індел	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Індел	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	Полі-С (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА (3), індел	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Індел	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Індел	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Н/Д	0,65	4859	0	1	4859	0	1

11	2	75	75	Полі-А (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	Полі-Т (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Н/Д	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	АТ (3), індел	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Н/Д	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	СТ (3), індел	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Індел	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	Полі-А (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	Полі-С (6), полі-Т (5), полі-А (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Н/Д	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	Полі-А (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0

27	4	62	62	Полі-А (7), індел	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Н/Д	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	ГТ (3), ССА (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Н/Д	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	Полі-А (6), індел	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	Полі-Т (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	СТ (4), АГ (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Індел	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	Полі-Г (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Індел	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	ССТ (5), індел	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Полі-Т (5), ТСТ (3), СТТ (3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Індел	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	Полі-С (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	Полі-Г (5), індел	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	Полі-А (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Н/Д	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Індел	0,35	5279	0	1	5276	0	4

45	7	87	87	Полі-А (7), АГ (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Індел	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	Полі-Г (5), індел	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	Полі-Г (6), полі-С (6), індел	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Н/Д	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Індел	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Н/Д	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	Полі-Г (7), СТС (4), індел	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Індел	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	Полі-Г (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Індел	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Н/Д	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	АТ (3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	Полі-Г (5), індел	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	СС (3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	Полі-Т (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0

63	10	95	95	Індел	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	АС (11), індел	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Н/Д	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Н/Д	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Н/Д	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Індел	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Н/Д	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Індел	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Н/Д	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	Полі-А (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Н/Д	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	Полі-С (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Індел	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Полі-А (5), СА (3), індел	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	СА (3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	Полі-С (5), індел	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	Полі-А (7), АС (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	Полі-А (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	12	95	95	Полі-С (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95

83	13	73	73	Н/Д	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	Полі-А (5), полі-Т (7), полі-А (7), індел	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Індел	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Індел	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	Н/Д	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	Полі-Т (5), індел	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Індел	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Індел	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	Полі-А (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Індел	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	Полі-С (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Індел	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	Полі-G (5), індел	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	Полі-Т (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Індел	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Н/Д	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Індел	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Н/Д	0,27	3780	0	0	3780	0	0

102	16	95	95	Полі-С (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	ТА (3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	Полі-С (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	Полі-Т (5), індел	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	СС (3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	Полі-С (5), індел	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Індел	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Індел	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	Полі-Т (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	307
112	17	91	91	Полі-А (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	Полі-А (7), АТ (3), АТ (4), АТ (4), індел	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Індел	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	Полі-Т (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	Н/Д	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	Полі-А (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9

120	18	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	СТС (3), індел	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	СТ (3), індел	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Н/Д	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Н/Д	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Н/Д	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Н/Д	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Н/Д	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	АС (3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	СТ (3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	ГТ (3), ТГ (4), індел	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Індел	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Індел	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	Полі-С (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Індел	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Індел	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	Полі-Т (6), СА (3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	ГТ (3), індел	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	Полі-А (6), АС (3), індел	0,32	4119	0	31	4113	0	37



139	21	90	90	Полі-Т (5), полі-А (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Індел	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Н/Д	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Індел	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Н/Д	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Індел	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	Х	69	69	Полі-Т (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	Х	69	69	Полі-С (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	Х	71	71	Н/Д	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	У	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	0	0	0
149	У	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	0	0	0
150	У	71	0	Полі-А (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Результати дослідження відтворюваності були проаналізовані залежно від оператора з використанням частоти варіантів (табл. 18). Цей аналіз продемонстрував, що частоти варіантів збігались у всіх операторів. Представлені середні частоти варіантів  $\pm 1$  стандартне відхилення.

**Таблиця 18** Залежні від оператора результати для приладу MiSeqDx

Діапазон частот варіантів	К-ть унікальних варіантів	Загальна к-ть варіантів, проаналізована оператором 1	Загальна к-ть варіантів, проаналізована оператором 2	Середня (СВ) зареєстрована частота варіанта, оператор 1	Середня (СВ) зареєстрована частота варіанта, оператор 2
Висока частота (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,05
Середня частота (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04
Низька частота (3-7 %)	620	618	612	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01

Результати дослідження відтворюваності для кожного зразка наведені сумарно для всіх восьми прогонів (табл. 19). Виявлення оцінюється окремо для кожного типу варіанта — SNV, інсерції й делеції окремо. Референсні позиції виключено. Цей аналіз продемонстрував, що результати для варіантів були відтворюваними для всіх зразків.

Таблиця 19 Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	SNV				Інсерції				Делеції			
	Загалом	Загалом ІІ	Загалом ХІІ	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІІ	Загалом ХІІ	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІІ	Загалом ХІІ	Загалом ХН
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 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877- D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup> Варіанти з частотою більше 20 %.

<sup>2</sup> Варіанти з частотою менше 20 %.

Дані, отримані після 8 прогонів у цьому дослідженні відтворюваності, підтверджують гіпотезу, що прилад MiSeqDx може стабільно секвенувати:

- Уміст GC  $\geq$  19 % (усі розпізнані основи в 120 зі 120 секвенованих ампліконів з умістом GC 19 % розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 3,4 %)
- Уміст GC  $\leq$  73 % (усі розпізнані основи в 120 зі 120 секвенованих ампліконів з умістом GC 73 % розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,1 %)
- Фрагменти полі-А довжиною  $\leq$  8 (повтор полі-А з 8 нуклеотидів розпізнано правильно для 120 зі 120 секвенованих ампліконів, які містять полі-А в кількості 8)
- Фрагменти полі-Т довжиною  $\leq$  10 (повтор полі-Т з 10 нуклеотидів розпізнано правильно для 120 зі 120 секвенованих ампліконів, які містять полі-Т в кількості 10)
- Фрагменти полі-Г довжиною  $\leq$  6 (повтор полі-Г із 6 нуклеотидів розпізнано правильно для 720 із 720 секвенованих ампліконів, які містять полі-Г в кількості 6)
- Фрагменти полі-С довжиною  $\leq$  6 (повтор полі-С із 6 нуклеотидів розпізнано правильно для 359 з 360 секвенованих ампліконів, які містять полі-С в кількості 6, з 1 нерозпізнаванням)

- Довжини динуклеотидних повторів  $\leq 4x$  (усі розпізнані основи в 600 із 600 секвенованих ампліконів із динуклеотидним повтором  $4x$  було розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,4 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів  $\leq 5x$  (усі розпізнані основи в 120 зі 120 секвенованих ампліконів із тринуклеотидним повтором  $5x$  було розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 1,9 %)
- Інсерції основ у кількості не більше 24 або делеції основ у кількості не більше 25
  - 24-основні інсерції розпізнано правильно в 120 зі 120 зразків
  - 25-основні делеції розпізнано правильно в 182 зразках і зареєстровано як нерозпізнавання у 2 зразках зі 184

## Дослідження 2

Зовнішнє дослідження було проведено для оцінки відтворюваності репрезентативного 2-генного аналізу, описаного в дослідженні точності 2. Воно проводилось у 3 зовнішніх центрах тестування (2 оператори на центр) з використанням 1 серії реагенту протягом 3 непослідовних випробувальних днів. Випробування проводилося за допомогою 6 точно охарактеризованих панелей зразків геномної ДНК, видученої зі зразків FFPE, отриманих від пацієнтів, або клітинних ліній. Кожна панель складалася з 10 елементів із загальною кількістю 60 елементів на всіх панелях.

60 елементів панелей включали дублікати 4 унікальних зразків дикого типу (для панельних мутацій), 12 унікальних мутантних зразків (з окремою мутацією), підготовлених як для високої, так і для низької частоти мутацій, а також 2 унікальних мутантних зразків (з окремою мутацією), підготовлених лише для низької частоти мутацій. Кожний унікальний зразок / зразок певного рівня частоти мутацій (випробуваних у двох екземплярах у кожному прогоні) мав 36 можливих результатів (2 повторності  $\times$  2 оператори  $\times$  3 дні  $\times$  3 центри), якщо всі результати були придатними.

Відсоток прогнозованих розпізнавань (ВПР) поміж усіх позитивних і негативних результатів для варіантів оцінювався через порівняння результату репрезентативного аналізу з результатом аналізу прогнозованих мутацій (прогнозовану мутацію виявлено або не виявлено) у кожному зразку. ВПР обчислюється як кількість прогнозованих розпізнавань, розділена на кількість спроб розпізнавань, помножена на 100 %. Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

У разі поєднання даних від різних центрів показник проходження контролю якості зразками становив  $\geq 94,7$  % для першого прогону зразка або для зразків, досліджених у прогонах, які були придатні під час першого проходження. ВПР для рівня мутацій у всіх мутантних зразках становив 99,6 % (905/909) (95%-й ДІ: 98,9; 99,8). Кількість спроб розпізнавань щодо всіх 56 панельних мутацій (незалежно від того, чи була виявлена мутація прогнозованою) для всіх придатних зразків становила 58 856 (56  $\times$  1051). З цих 58 856 виявлених мутацій лише в 6 випадках виявлені й прогнозовані результати були розбіжними. ВПР для рівня мутацій поміж позитивних і негативних варіантів з усіх мутантних і диких елементів панелі в поєднанні становив 99,99 % (58 850/58 856).

### Аналітична чутливість (межа холостої проби (МХП) і межа виявлення (МВ))

У цьому дослідженні верифікували граничне значення аналізу й визначали межу виявлення (МВ) для приладу MiSeqDx за умови використання з репрезентативною панеллю. Суть полягала в тому, що зразки точно охарактеризованих клітинних ліній Platinum Genome GM12878 і GM12877 фіксувалися у формаліні та заливалися парафіном, після чого було проведено екстракцію ДНК. GM12878 було розведено GM12877 таким чином, щоб варіантні частоти сімдесяти варіантів (52 SNV, дев'ять інсерцій і дев'ять делецій) становили приблизно 0,05. Два зразки ДНК було протестовано двома операторами за допомогою двох приладів і двох серій реагентів у загальному обсязі 10 прогонів секвенування MiSeqDx. У результаті цього було проаналізовано по 40 повторностей для кожного варіанта лінії GM12878 і по 60 повторностей для кожної відповідної координати дикого типу лінії GM12877 для кожної серії реагентів. МХП і МВ було обчислено за допомогою класичного підходу, описаного в стандарті CLSI EP17-A2, з використанням непараметричних методів оцінки. МХП і МВ було обчислено для SNV, інсерцій і делецій окремо за допомогою об'єднання частот варіантів для заданого типу варіанта. Помилку першого роду було встановлено на рівні 0,01, помилку другого роду — на рівні 0,05.

Для МХП пул частот варіантів було відсортовано від найнижчої до найвищої частоти, також для кожної серії реагентів для кожного типу варіанта було обчислено 99-те значення рангу (табл. 20). У програмному забезпеченні MiSeqDx використовується граничне значення (межа вимірювання МХП), яке дорівнює 0,026 частоти варіанта, для визначення межі якісного виявлення варіантів. Обчислені межі холостої проби для цього граничного значення дають помилку першого роду не більше 0,01.

Таблиця 20 Межа холостої проби

Тип варіанта	Загальна кількість частот варіантів	МХП, серія реагентів 1 (%)	МХП, серія реагентів 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Інсерція	540	0,79	0,60
Делеція	540	0,96	0,84

Для МВ було обчислено відсоток частоти окремої мутації для кожної серії реагентів для кожного типу варіанта, який був нижче граничного значення 0,026 (табл. 21). Значення відсотків були менше помилки другого роду в 5 % (0,05), тому медіану суми частот варіантів було обчислено як МВ (табл. 22). МВ для кожного типу варіанта було прийнято як найбільше з двох значень, обчислених для двох серій реагентів — 5,45 % для SNV, 4,88 % для інсерцій і 5,44 % для делецій.

Таблиця 21 Межа виявлення

Серія реагентів	Тип варіанта	Загальна кількість частот варіантів	К-ть вимірювань частоти варіантів < 2,6 %	% вимірювань ВЧ < 2,6 %	Межа виявлення (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Інсерція	360	0	0,00	4,86
	Делеція	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Інсерція	360	0	0,00	4,88
	Делеція	360	0	0,00	5,24

Наведені нижче дослідження продемонстрували експлуатаційні характеристики приладу MiSeqDx під час проведення іншого репрезентативного аналізу 56 мутацій для двох клінічно значущих генів раку (панель мутацій). Панель мутацій призначено саме для виявлення 56 мутацій у двох клінічно значущих генах раку

(ген 1 і ген 2). Під час аналізу одночасно визначається присутність або відсутність кожної з 56 мутацій у кожному секвенуваному зразку. Еталонним методом для цих досліджень було двонапрямне секвенування Сенгера.

### Міжсерійна прецизійність

Дослідження міжсерійної прецизійності було проведено для оцінювання роботи приладу MiSeqDx із низкою серій готових наборів реагентів (які складаються з реагентів для кваліфікації зразка, підготовки бібліотеки та секвенування) за допомогою 2-генного репрезентативного аналізу з використанням панелі з 5 сумішей зразків FFPE, які відповідають вимогам до кваліфікації зразка. Кожний зразок FFPE містив 2 унікальні мутації: одна з низькою частотою мутації (приблизно 8 %), а інша — з високою (приблизно 14 %). Протягом 3 непослідовних днів було проведено 12 (дванадцять) спостережень для кожної з 5 сумішей зразків із використанням 3 серій набору реагентів. Загальна кількість спостережень для дослідження всіх серій реагентів становила 180 спостережень для всіх сумішей зразків і 360 спостережень для всіх рівнів частоти мутації. У всіх серіях і в усі дні прогнозований результат щодо мутацій було виявлено в 99,7 % (359/360) випадків спостережень. Одну мутацію з низькою частотою було неправильно розпізнано як дикий тип. Для кожної з мутацій / кожного з рівнів частоти мутацій було проведено аналіз компонентів дисперсії з метою оцінки варіабельності системи. Загальне стандартне відхилення варіювалося від 0,011 до 0,029. Значення компонента «серія реагентів» для загального стандартного відхилення варіювалося від 0 до 0,015.

## Патенти й товарні знаки

Цей документ і його зміст є власністю компанії Illumina, Inc. і її філій (надалі — «Illumina») і призначений виключно для того, щоб користувач використовував вироби виключно за угодою в цілях, описаних у цьому документі. Цей документ і його зміст не слід використовувати або поширювати з будь-якою іншою метою та/або для іншого обговорення, розкриття або відтворення тим або іншим чином без попередньої письмової згоди компанії Illumina. Цим документом компанія Illumina не надає жодного дозволу на свій патент, товарний знак, авторське право або загальноприйняті права, а також на подібні права будь-яких третіх сторін.

Щоб гарантувати правильне та безпечне використання виробів, описаних у цьому документі, кваліфікований і належним чином навчений персонал повинен суворо та чітко дотримуватись інструкцій, описаних у цьому документі. Перед використанням цих виробів потрібно повністю прочитати й зрозуміти весь уміст цього документа.

**НЕПОВНЕ ВИВЧЕННЯ ВСІХ ЗАЗНАЧЕНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ ВКАЗІВОК І ЇХ НЕЧІТКЕ ДОТРИМАННЯ МОЖЕ ПРИЗВОДИТИ ДО ПОШКОДЖЕННЯ ЦИХ ВИРОБІВ, ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ, ВКЛЮЧНО З КОРИСТУВАЧАМИ АБО ІНШИМИ ОСОБАМИ, І ПОШКОДЖЕННЯ ІНШОЇ ВЛАСНОСТІ.**

**КОМПАНІЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕ ЖОДНОЇ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ, ЩО ВИНИКАЄ ВНАСЛІДОК НЕНАЛЕЖНОГО ВИКОРИСТАННЯ ВИРОБІВ, ОПИСАНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ (ВКЛЮЧНО З ЙОГО ЧАСТИНАМИ АБО ПРОГРАМНИМ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯМ).**

© Illumina, Inc., 2021. Усі права захищено.

Illumina, MiSeqDx, TruSeq, гарбузово-помаранчевий колір, а також зображення у вигляді спіральних послідовностей нуклеотидних основ є товарними знаками компанії Illumina, Inc. та/або її філій у США та/або інших країнах. Решта назв, логотипів і товарних знаків є власністю компанії Illumina, Inc. або їхніх відповідних власників.

## Контактна інформація



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A. (США)  
+1 800 809.ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (за межами Північної Америки)  
techsupport@illumina.com  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B.V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
The Netherlands  
(Нідерланди)

Австралійський спонсор:  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Australia (Австралія)

## Маркування виробу

Повний список символів, які може бути зображено на упаковці або маркуванні виробу, див. у поясненні символів на вебсайті [support.illumina.com](http://support.illumina.com) на вкладці *Documentation and Literature* (Документи й література) для вашого набору.