

Příbalový leták pro přístroje se systémem MOS v4p

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO. POUZE PRO EXPORT.

Účel použití

Přístroj MiSeqDx je určen k cílenému sekvenování knihoven DNA pořízených z DNA lidského genomu extrahované z periferní plné krve nebo tkáně fixované formalínem a zalité do parafínu (FFPE) při provádění rozborů *in vitro* diagnostiky (IVD) na tomto přístroji. Přístroj MiSeqDx není určen k sekvenování celého genomu ani sekvenování *de novo*. Přístroj MiSeqDx je třeba používat s registrovanými, zapsanými, povolenými nebo schválenými IVD reagensii a analytickým softwarem.

Principy postupu

Přístroj Illumina MiSeqDx je určen k cílenému opakovanému sekvenování lidské DNA pomocí spotřebního materiálu Illumina pro sekvenování a knihoven připravených z DNA lidského genomu extrahované z periferní plné krve nebo tkáně FFPE pomocí registrovaných, zapsaných, povolených nebo schválených IVD reagensii. Knihovny jsou připravovány prostřednictvím amplifikace cílů a připojení indexů vzorků a zachycených sekvencí. Knihovny vzorků se zachytí v průtokové kyvetě a jsou přístrojem sekvenovány pomocí chemikálií pro technologii SBS (Sequencing by synthesis). Technologie SBS využívá metodu reverzibilního terminátoru k detekci jednotlivých nukleotidových bází tak, jak se začleňují do rostoucích řetězců DNA. Software Real-Time Analysis (RTA) provádí analýzu snímků a přiřazení bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přiřadí kvalitativní skóre. Když je primární analýza dokončena, provede se přístrojem MiSeqDx sekundární analýza, která zpracuje přiřazení bází.

Zpracování typicky zahrnuje demultiplexování, generování souborů FASTQ, zarovnání, přiřazení variant a generování souborů ve formátu přiřazení variant (variant call format, VCF), které obsahují informace o variantách nalezených na konkrétních pozicích v referenčním genomu. V závislosti na pracovním postupu využívá MiSeqDx pro sekundární analýzu různé moduly.

Konfigurace s duálním bootováním

Konfigurace s duálním bootováním zahrnuje hardware, software a instalační postupy, které umožňují přístroji MiSeqDx provádět sekvenační testy pro diagnostiku *in vitro* (IVD) i pro výzkumné účely (RUO). Konfigurace s duálním bootováním umožňuje uživateli přepínat mezi diagnostickým režimem a výzkumným režimem přístroje. Čipy radiofrekvenční identifikace (RFID) na spotřebním materiálu pro sekvenování brání použití reagensii pro sekvenování pro výzkumné účely (RUO) v diagnostických bězích sekvenování.

Omezení postupu

- Určeno k diagnostice *in vitro*.
- Výsledky prezentované na štítku byly dosaženy pomocí reprezentativních panelů rozborů používajících periferní plnou krev nebo buněčné linie pro posouzení germinální účinnosti a tkáně FFPE nebo buněčné linie FFPE pro posouzení somatické účinnosti s popsány reagenциemi a softwarovými moduly. Moduly Germline Variant a Somatic Variant byly vyvinuty pro účely hodnocení účinnosti reprezentativními rozborů. Výkonnostní charakteristiky jsou uváděny pouze pro informační účely. Uvedené validační testování slouží jen jako příklad obecných možností přístroje a nepředstavuje jeho možnosti nebo vhodnost ve vztahu ke konkrétním tvrzením. Všechny diagnostické testy vyvinuté pro použití na tomto přístroji vyžadují plnou validaci všech aspektů výkonnosti.
- Produkt je omezen na následující výstupy:
 - Výstup sekvenování ≥ 5 Gb při délce čtení 2×150 bp
 - Filtr úspěšnosti čtení ≥ 15 milionů při délce čtení 2×150 bp
 - Báze vyšší než Q30 ≥ 80 % při délce čtení 2×150 bp
Nejméně 80 % bází má kvalitativní skóre Phred větší než 30, což znamená, že přesnost přiřazení báze je větší než 99,9 %.
- Přístroj MiSeqDx byl validován jen pro sekvenování knihoven lidské DNA extrahované z periferní plné krve nebo tkáně FFPE. Knihovny generované z jiných typů vzorků by se s tímto přístrojem neměly používat pro diagnostiku *in vitro*. Účinnost tohoto přístroje pro sekvenování mikrobiálních nebo virových nukleových kyselin z klinických vzorků nebyla stanovena.
- Přístroj MiSeqDx je určen pro diagnostiku *in vitro* s registrovanými, zapsanými, povolenými nebo schválenými IVD reagenциemi nebo rozborů. Omezení pro reagenциe a charakteristiky účinnosti popsané v tomto příbalovém letáku jsou založeny na reprezentativních rozbořech a softwarových modulech. Určené použití, detekované varianty a typy vzorků u rozborů IVD jsou popsány v příbalovém letáku daného rozborů.
- Obsažené indely (inzerce, delece a jejich kombinace) o délce větší než 25 bp nejsou softwarem pro rozbor zarovnány. Proto se indely delší než 25 bp nedají tímto softwarem pro rozbor zjistit.
- Systém byl validován pro detekci jednonukleotidových variant (SNV) a delecí o délce až 25 bp a inzerce o délce až 24 bp při použití se softwarem s moduly Germline Variant a Somatic Variant. Pro somatická přiřazení, při frekvenci variant 0,05, byly detekovány delece 25 bp a inzerce 18 bp.
- Software pro rozbor nemusí zarovnat čtení amplikonů s extrémním obsahem variant, což má za následek, že daná oblast se vykáže jako divoký typ. Takový extrémní obsah zahrnuje:
 - Čtení obsahující více než tři indely.
 - Čtení o délce alespoň 30 bp s obsahem SNV větším než 4 % celkové cílové délky amplikonu (vyjma oblastí sondy).
 - Čtení o délce menší než 30 bp s obsahem SNV větším než 10 % celkové délky amplikonu (včetně oblastí sondy).

- Velké varianty, včetně vícenukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné menší varianty.
- Varianty delece lze filtrovat nebo opomenout při překlenování dvou dlaždicových amplikonů, pokud je delece delší nebo rovna překrytí mezi dlaždicovými amplikony.
- Systém nedokáže detekovat indely, pokud sousedí přímo s primerem a není zde žádný překrývající se amplikon. U oblastí s překrývajícími se amplikony test nedokáže detekovat delece, pokud je oblast překrytí menší než velikost delece, která se má detekovat. Pokud například oblast překrytí dvou sousedících amplikonů zahrnuje dvě (2) báze, rozbor nedokáže detekovat žádné delece zahrnující obě tyto báze. Lze detekovat delecii u jedné z těchto bází.
- Podobně jako u jakéhokoliv pracovního postupu přípravy knihovny na bázi hybridizace mohou vlastní polymorfismy, mutace, inserce či delece ve vazebných oblastech oligonukleotidů ovlivnit alely, na něž sonda cílí. Tím jsou ovlivněna i přiřazení uskutečněná v průběhu sekvenování. Příklad:
 - Varianta ve fázi s variantou v oblasti primeru nemusí být amplifikována, což má za následek falešně negativní výsledek.
 - Varianty v oblasti primeru by mohly zabránit amplifikaci referenční alely, což by vedlo k nesprávnému signálu homozygotní varianty.
 - Varianty indelů v oblasti primeru mohou způsobit falešně pozitivní přiřazení na konci čtení sousedícího s primerem.
- Pokud se indely vyskytnou poblíž konce jednoho čtení a během seřazení se jemně připnou, lze je kvůli vychýlení vláken filtrovat.
- Malé MNV nebyly validovány.
- Varianty počtu kopií nebo strukturní varianty, například fúze nebo translokace, nebyly validovány.
- Specifická omezení týkající se germinálních variant:
 - Systém MiSeqDx využívající modul Germline Variant je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky přiřazení germinálních variant (např. homozygotních, heterozygotních, divokého typu).
 - Při použití s modulem Germline Variant je pro přesné přiřazení variant potřeba minimální pokrytí na amplikon 150x. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
 - Zda bude varianta identifikována jako homozygotní nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
 - Varianty v určitém opakujícím se kontextu se vyfiltrují do souborů VCF. Filtr opakování RMxN se používá k filtrování variant, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá sekvence varianty nebo její část. Pro přiřazení germinální varianty vyžaduje filtrace varianty minimálně devět opakování v referenci, přičemž se zohlední pouze opakování o délce do 5 bp (R5x9).
- Specifická omezení týkající se somatických variant:
 - Systém MiSeqDx využívající modul Somatic Variant je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky přiřazení somatických variant (tj. přítomnosti somatické varianty s frekvencí varianty větší než nebo rovné 0,026 s mezí detekce 0,05).

- Při použití s modulem Somatic Variant je pro přesné přiřazení variant potřeba minimální pokrytí na fondy oligonukleotidů 450x. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
- Varianty v určitém opakujícím se kontextu se vyfiltrují do souborů VCF. Filtr opakování RMxN se používá k filtrování variant, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá sekvence varianty nebo její část. U přiřazení somatických variant je pro filtrování varianty potřeba alespoň 6 opakování v referenci, přičemž se berou v úvahu pouze opakování o délce max. 3 bp (R3x6).
- Modul pro analýzu somatických variant nedokáže rozlišit mezi germinálními a somatickými variantami. Modul je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
- Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založena na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádorové a normální tkáně.

Složky produktu

Illumina MiSeqDx obsahuje následující:

Přístroj MiSeqDx (Katalogové číslo DX-410-1001)

Následující softwarové komponenty jsou pro provoz přístroje MiSeqDx a jeho použití k analýze dat nutné:

Softwarová aplikace	Funkce	Popis
Operační software MiSeq (MOS)	Řídí provoz přístroje	Softwarová aplikace MOS řídí provoz přístroje během sekvenování a vytváří snímky pro použití softwarem Real-Time Analysis (RTA). Další informace viz <i>Referenční příručka přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4 (dokument č. 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Provádí primární analýzu	Softwarová aplikace RTA konvertuje snímky generované MOS pro každou dlaždici na cyklus běhu sekvenování do souborů přiřazení bází, které slouží jako vstupy pro analytické moduly softwaru Local Run Manager. Softwarová aplikace RTA neobsahuje uživatelské rozhraní.
Local Run Manager	Rozhraní pro výběr modulu	Software Local Run Manager je řešení pro správu uživatelů, provádění sekundární analýzy a monitorování stavu, které je integrované přímo do přístroje. Další informace viz <i>Příručka softwaru Local Run Manager v4 pro MiSeqDx (dokument č. 200046657)</i> .

Skladování a manipulace

Prvek	Specifikace
Teplota	Přeprava a skladování: -10 °C až 40 °C Provozní podmínky: 19 °C až 25 °C
Vlhkost	Přeprava a skladování: Nekondenzující vlhkost Provozní podmínky: relativní vlhkost 30–75 % (nekondenzující)

Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí dodávky

Spotřební materiál pro sekvenování

Sada reagensů MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalogové č. 20037124)

Sada reagensů MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Katalogové č. 20063860)

Spotřební materiál dodaný uživatelem

Před zahájením sekvenování se ujistěte, že je k dispozici následující spotřební materiál dodávaný uživatelem.

Spotřební materiál	Účel
Čisticí ubrousky se 70 % isopropylalkoholem nebo Ethanol, 70 %	Čištění skla a stolku průtokové kyvety
Laboratorní utěrky, netkané	Čištění stolku průtokové kyvety
Papír na čočky, 10 × 15 cm	Čištění průtokové kyvety
Tween 20	Mytí přístroje
Pinzeta, plastová se čtvercovým hrotem (volitelně)	Vyjmutí průtokové kyvety z přepravního kontejneru
Voda, laboratorní jakost	Mytí přístroje

Pokyny ohledně vody laboratorní jakosti

Při provádění postupů na přístroji vždy používejte pouze vodu laboratorní jakosti nebo deionizovanou vodu. Nikdy nepoužívejte kohoutkovou vodu.

Používejte pouze vodu následující nebo rovnocenné jakosti:

- Deionizovaná voda
- Illumina PW1
- Voda s jakostí 18 megaohmů (MΩ)
- Voda Milli-Q
- Voda Super-Q
- Voda pro molekulární biologii

Varování a preventivní opatření



VAROVÁNÍ

Tato sada reagensií obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Ventilace v místnosti musí být přiměřená pro manipulaci s nebezpečnými látkami v reagensiích. Používejte ochranné pomůcky, včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensiemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.

- Se všemi vzorky krve zacházejte tak, jako by byly infikovány virem lidské imunodeficiency (HIV), lidským virem hepatitidy B (HBV) a dalšími krevními patogeny (univerzální opatření).
- Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagensií používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagensií si důkladně umyjte ruce.
- Dodržujte postupy správné laboratorní praxe a hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci reagensií, přístrojů a genomických vzorků DNA produkty PCR. Kontaminace PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.
- Aby se zabránilo kontaminaci, dbejte, aby se pro oblasti před amplifikací a po amplifikaci používalo vyhrazené vybavení a spotřební materiál (např. pipety, špičky pipet, tepelné bloky, vortexery a centrifugy).
- Tam, kde to má smysl, se párování indexů se vzorky musí přesně shodovat s tištěným rozvržením desky. Local Run Manager automaticky vyplní indexové primery související s názvy vzorků, když se zadají do modulu. Doporučuje se, aby uživatel před spuštěním běhu sekvenování ověřil, že jsou indexační primery správně přiřazeny ke vzorkům. Rozdíly mezi vzorky a rozvržením destičky vyústí ve špatnou identifikaci pozitivních vzorků a vykazování nesprávných výsledků.
- Velmi se doporučuje, aby si uživatel nainstaloval antivirový software, který bude počítač chránit proti virům. Pokyny k instalaci naleznete v uživatelské příručce.
- Přístroj MiSeqDx nepoužívejte, pokud je z něj sejmuto kterýkoli z krycích panelů. Používání přístroje, když jsou sejmuty některé z panelů, představuje riziko úrazu střídavým nebo stejnosměrným elektrickým proudem.
- Nedotýkejte se stolku pro průtokovou kyvetu v prostoru průtokové kyvety. Ohřívač v tomto prostoru může mít teplotu 22 °C až 95 °C a mohl by způsobit popáleniny.
- Přibližná hmotnost přístroje je 57 kg, takže v případě pádu nebo nevhodného zacházení může způsobit vážné poranění osob.
- Veškeré závažné události související s tímto produktem neprodleně nahlase společnosti Illumina a příslušným orgánům členského státu, ve kterém uživatel nebo pacient působí.

Návod k použití

K postupu podle následujícího návodu k použití přístroje MiSeqDx jsou potřeba reagenty obsažené v sadě reagentů Sada reagentů MiSeqDx Reagent Kit v3.

Vytvoření běhu pomocí Local Run Manager

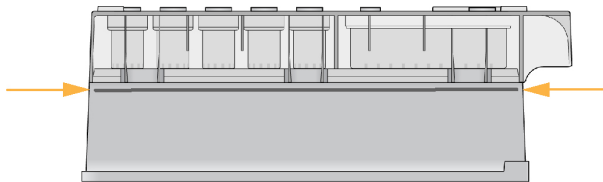
Podrobné pokyny pro vytvoření běhu naleznete v příručce s názvem *Příručka softwaru Local Run Manager v4 pro MiSeqDx (dokument č. 200046657)* a příručce k modulu Local Run Manager pro analytický modul, který používáte.

Příprava kazety reagentů

Následující návod popisuje, jak rozmrazit reagenty pomocí vodní lázně o pokojové teplotě.

1. Kazetu reagentů vyjměte ze skladovacích prostor s teplotou od -15 °C do -25 °C .
2. Umístěte kazetu reagentů do vodní lázně s dostatečným množstvím deionizované vody pokojové teploty, aby byla základna kazety reagentů ponořena až po rysku vyznačenou na kazetě reagentů. Voda nesmí překročit maximální čáru ponoru.

Obrázek 1 Maximální čára ponoru



3. Nechte kazetu reagentů rozmrazovat ve vodní lázni o pokojové teplotě po dobu 60–90 minut nebo dokud zcela nerozmrzne.
4. Vyjměte kazetu z vodní lázně a jemně s ní poklepejte o stůl, aby se ze základny kazety uvolnila voda. Osušte základnu kazety. Zkontrolujte, zda na horní část kazety reagentů nestříkla voda.

Kontrola kazety reagentů

1. Kazetu reagentů desetkrát obraťte nahoru a dolů, aby se rozmrazené reagenty promíchaly, a pak zkontrolujte, zda jsou rozmrazeny všechny pozice.
2. Zkontrolujte, zda jsou reagenty v pozicích 1, 2, a 4 zcela promíchány a zda se v nich nenachází sraženiny.

POZNÁMKA Pro správné sekvenování je nezbytné, aby byly reagenty v kazetě důkladně rozmrazeny a promíchány.

3. Opatrně kazetou poklepejte o pracovní stůl, abyste snížili počet vzduchových bublinek v reagentech.

POZNÁMKA Nasávací trubičky přístroje MiSeqDx zasahují na dno každého zásobníku za účelem nasávání reagensí, a proto je důležité, aby v zásobnících nebyly vzduchové bubliny.

- Umístěte kazetu reagensí na led nebo ji ponechte při teplotě 2 °C až 8 °C (až na šest hodin), dokud nebude připravena k nastavení testu. Nejlepších výsledků dosáhnete, přikročíte-li pak přímo k vložení vzorku a nastavení běhu.

Příprava vzorků na sekvenování

Pokyny k přípravě knihovny vzorků pro sekvenování včetně ředění a vkládání do fondu naleznete v návodu k použití v příbalovém letáku sady pro přípravu knihovny.

Ředění vzorků knihoven závisí na tom, nakolik komplexní jsou fondy oligonukleotidů. U přístroje MiSeqDx je nutná optimalizace hustoty klastrů a optimální hustota klastrů se liší podle konkrétní přípravy knihovny.

Vložení knihoven vzorků do kazety

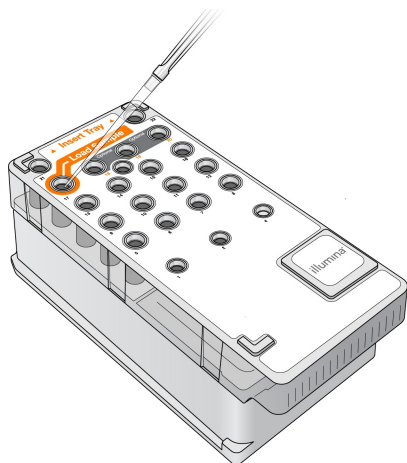
Když je kazeta reagensí zcela rozmrazená a připravená k použití, můžete do ní vložit vzorky.

- Pomocí samostatného, čistého a prázdného 1ml hrotu pipety propíchněte těsnicí fólii nad zásobníkem na kazetě reagensí s nápisem **Load Samples** (Vzorky k vložení).

POZNÁMKA Nepropichujte žádné jiné pozice s reagensími. Ostatní pozice s reagensími budou propíchnuty automaticky v rámci běhu.

- Do zásobníku **Load Samples** (Vložte vzorky) napipetujte 600 µl připravených knihoven DAL (Diluted Amplicon Library). Nedotýkejte se těsnicí fólie.
- Po vložení vzorku zkontrolujte, zda v zásobníku nejsou vzduchové bubliny. Pokud zjistíte přítomnost bublin, opatrně poklepejte kazetou o pracovní stůl, abyste bubliny uvolnili.

Obrázek 2 Vložení knihoven



4. Přejděte přímo k postupu nastavení běhu pomocí rozhraní Operační software MiSeq (MOS).

Nastavení běhu

Úplné pokyny k nastavení běhu viz *Referenční příručka přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4 (dokument č. 200010452)*.

1. K přístroji MiSeqDx se přihlaste svým heslem k softwaru Local Run Manager.
2. Na obrazovce Home (Domů) softwaru MOS vyberte **Sequence** (Sekvence).
3. Na seznamu vyberte běh, a poté vyberte **Next** (Další).
Otevře se série obrazovek nastavení cyklu v následujícím pořadí: Load Flow Cell (Vložení průtokové kyvety), Load Reagents (Vložení reagensů), Review (Kontrola) a Pre-Run check (Kontrola před během).
4. Když se objeví obrazovka Load Flow Cell (Vložení průtokové kyvety), vyčistěte a vložte průtokovou kyvetu.
5. Zavřete západku průtokové kyvety a dvířka prostoru průtokové kyvety.
Před spuštěním běhu musí být západka i dvířka prostoru průtokové kyvety zavřené. Po vložení průtokové kyvety software přečte a zaznamená RFID. Potvrzení o úspěšném přečtení RFID se zobrazí v pravém dolním rohu obrazovky.
6. Podle pokynů softwaru vložte láhev s roztokem MiSeqDx SBS Solution (PR2), zkontrolujte, že odpadní láhev je prázdná, a vložte kazetu reagensů.
Po vložení láhve MiSeqDx SBS Solution (PR2) a kazety reagensů software přečte a zaznamená RFID. Potvrzení o úspěšném přečtení RFID se zobrazí v pravém dolním rohu obrazovky.
7. Když se spustí běh, otevře se obrazovka Sequencing (Sekvenování). Tato obrazovka poskytuje vizuální reprezentaci probíhajícího běhu, a to včetně hodnot intenzity a kvalitativních skóre.

Výsledky

Software Real-Time Analysis (RTA) je integrovaný software, který provádí analýzu snímků a přiřazení bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přiřadí kvalitativní skóre. Když primární analýza skončí, modul přístroje MiSeqDx vybraný v části [Vytvoření běhu pomocí Local Run Manager na straně 7](#) spustí sekundární analýzu. Další pracovní postupy naleznete v dokumentaci příslušného rozboru.

Postupy kontroly kvality

Při vyhodnocování každého běhu, vzorku a přiřazení báze bere software MiSeqDx v úvahu metriky kontroly kvality. Pokud je to vyžadováno, měly by se z hlediska očekávaných výsledků vyhodnotit i pozitivní a negativní kontroly, které jsou součástí přípravy knihovny.

Charakteristiky funkčnosti

Všechny studie byly provedeny přístrojem MiSeqDx.

Germinální studie využívaly k přípravě knihovny buď rozbor MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, nebo reagensie sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Tyto dvě sady používají stejné reagensie pro přípravu knihovny a v jejich pracovním postupu je jen jeden rozdíl, a sice počet cyklů polymerázové řetězové reakce (PCR), který je u první 25 a u druhé 28. Další cykly PCR umožňují u sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx nižší vstup DNA (50 ng) oproti sadě MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), jak je vidět u studie vstupu DNA při použití sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Knihovny připravené pomocí sady rozboru MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay byly sekvenovány pomocí reagensií pro sekvenování, které jsou součástí sady. Knihovny připravené pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx byly sekvenovány pomocí reagensií ze sady Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3. Tyto reagensie pro sekvenování mají vyšší vstup oproti těm ze sady rozboru MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Testování se provádí se vzorky v rozsahu podporovaném sadou reagensií Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. V závislosti na rozboru může přístroj MiSeqDx podporovat 1–96 vzorků na běh. Sada reagensií Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro je navržena tak, aby pro vybrané rozborů podporovala nižší výkonnostní možnosti vzorků v daném rozsahu.

Somatické studie používaly sadu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx se sadou reagensií Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3.

Po pracovních postupech germinální nebo somatické studie, popsaných v návodu pro přípravu knihovny pro sekvenování pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, následovala analýza pomocí modulu Germline Variant nebo Somatic Variant se dvěma výjimkami. Studie používající jako reprezentativní panely mutací jediný gen (germinální účinnost; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) nebo dva geny (somatická účinnost) používaly pracovní postupy a analytické moduly specifické pro daný rozbor.

POZNÁMKA Obsah genomu ampliconu je sumarizován vzhledem k sekvenovanému vláknu genomu. U ampliconů negativního vlákna je referenční obsah genomu reverzní komplement (například oblasti PolyA na ampliconech negativního vlákna odpovídají oblastem PolyT referenčního genomu).

Definice výpočtů používaných v charakteristikách funkčnosti

- Procento pozitivní shody (PPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako varianty a jsou rozbohem správně vykázány.
 - $(\text{počet lokusů varianty správně vykázáných testem}) / (\text{celkový počet lokusů varianty})$
Lokusy varianty vykázané testem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně pozitivní (TP). Lokusy varianty vykázané rozbohem jako referenční přiřazení nebo jiná přiřazení varianty jsou falešně negativní (FN).
- Procento negativní shody (NPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako divoký typ a jsou rozbohem správně vykázány.
 - $(\text{počet lokusů divokého typu správně vykázáných rozbohem}) / (\text{celkový počet lokusů divokého typu})$

Lokusy divokého typu vykázané testem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně negativní (TN). Lokusy divokého typu vykázané rozbořem jako varianty jsou falešně pozitivní (FP).

- Celková procentuální shoda (OPA) se počítá jako poměr lokusů správně vykázaných testem vzhledem k referenční metodě.
 - $$\frac{((\text{počet lokusů varianty správně vykázaných testem}) + (\text{počet lokusů divokého typu správně vykázaných testem}))}{((\text{celkový počet lokusů varianty}) + (\text{celkový počet lokusů divokého typu}))}$$
- Pro přiřazení variant nezahrnují výpočty PPA, NPA a OPA žádná přiřazení (varianta nebo referenční lokus nespĺňují podmínky jednoho nebo více kvalitativních filtrů). Dvě studie ve své metrice „% správných přiřazení“ výslovně zahrnují varianty bez přiřazení a toto zahrnutí variant bez přiřazení je pro příslušné tabulky uvedeno.
- Míra přiřazení je vypočítána jako poměr celkového počtu lokusů, které splnily podmínky filtrů, k celkovému počtu pozic sekvenovaných pro chromozomy 1–22. Chromozomy X a Y jsou vyloučeny. Tato metrika nezohledňuje shodu přiřazení s referenční metodou.

Charakteristiky účinnosti související s preanalytickými faktory (například metodami extrakce nebo vstupem DNA) naleznete v příbalovém letáku příslušné metody přípravy knihovny.

Indexování vzorků

Indexační primery vzorků, přidané během přípravy knihovny, přiřazují každému vzorku DNA unikátní sekvenci, která umožňuje vložit několik vzorků společně do fondu a vytvořit tak jediný běh sekvenování. Indexování vzorků bylo otestováno pro germinální i somatické pracovní postupy.

Celkem 96 vzorků bylo testováno reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na vlákno u všech 23 lidských chromozomů, aby se ověřila schopnost rozboru konzistentně činit u daného vzorku s různými kombinacemi indexačních primerů genotypová přiřazení. Chromozom Y neobsahuje spolehlivé oblasti a nebyl vyhodnocován. Testovalo se osm unikátních vzorků s 12 různými kombinacemi indexačního primeru na vzorek. Výsledky vzorků získané modulem pro germinální analýzu (Germline Analysis Module) se porovnaly s genomy Platinum Genome verze 2016-01. PPA (SNV a indely) překročilo 97 % (správných pozitivních přiřazení bylo nejméně 70 u SNV, 38 u inzercí, 36 u delecí) a NPA bylo 100 % (nejméně 23 440 referenčních pozic na každou kombinaci indexů) pro všech 96 kombinací indexů. Nezávisle byl testován jeden index pro ověření, že použití reagentů ze sady Sada reagentů MiSeqDx Reagent Kit v3 podporuje i méně než osm vzorků (u předchozího produktu MiSeqDx Universal Kit 1.0 bylo nutné mít nejméně osm vzorků). Tento index měl hodnoty PPA 98,9 % (180/182) pro SNV, 100 % (38/38) pro inzercce a 100 % (46/46) pro delecce. NPA bylo 100 % (23 856/23 856).

Pro měření přesnosti indexů u somatických variant bylo testováno dvanáct replikátů (24 knihoven) vzorku na frekvencích 0,05–0,10 pomocí modulu Somatic Variant (pro somatická přiřazení se používají dvě kombinace indexů na každý replikát). PPA bylo 100 % u SNV (64/64), inzercí (11/11) i delecí (19/19). NPA bylo 100 % (nejméně 11 590 referenčních pozic na každou kombinaci indexů) u všech kombinací indexů.

Přenos vzorků

Pracovní postupy přístroje MiSeqDx zahrnují přípravu knihovny a sekvenování několika vzorků plus kontroly, a to vše současně. Pro vyhodnocení, zda falešně pozitivní výsledky v důsledku kontaminace při přenosu mezi jamkami během přípravy knihovny či kontaminace při přenosu mezi po sobě jdoucími běhy sekvenování ovlivní výsledky testů, byla provedena studie přenosu vzorků. Byly použity somatické varianty, protože ty lze detekovat na nižší frekvenci alely než germinální varianty.

Vzorky tvořily čtyři vzorky genomové DNA z buněčných linií, z nichž každý obsahoval různé panelové mutace v reprezentativním rozboru dvou genů. Vzorky byly uspořádány tak, že mutace na některé pozici v jednom z nich měla referenční sekvenci (divokého typu) v ostatních.

Přenos mezi jamkami je definován jako chybový stav potenciálně vznikající při manuálních krocích zpracování (pipetování, míchání vzorků atd.). Pro vyhodnocení přenosu z jedné jamky na vzorky do jiné byl provedeny dva testovací běhy:

- Šachovnicové uspořádání vzorku genomové DNA (gDNA) s vysokým vstupním množstvím obsahujícího mutaci v genu 1, který se střídá se vzorkem gDNA s nízkým vstupním množstvím obsahujícího mutaci v genu 2.
- Šachovnicové uspořádání vzorku gDNA s vysokým vstupním množstvím obsahujícího mutaci v genu 2, který se střídá se vzorkem gDNA s nízkým vstupním množstvím obsahujícího mutaci v genu 1.

V každém běhu bylo na falešnou pozitivitu vyhodnoceno celkem 12 replikátů (např. mutace genu 1 vykázaná v jamce označené jako vzorek mutace genu 2 nebo naopak).

Přenos mezi běhy je definován jako chybový stav potenciálně vznikající v důsledku zbytků z předchozího běhu sekvenování. Pro zjištění, zda existuje přenos mezi běhy sekvenování, byly připraveny dvě desky, každá s 11 replikáty jediného unikátního vzorku gDNA s vysokým vstupním množstvím, plus vzorek blanků, a ty pak byly postupně sekvenovány na jednom přístroji MiSeqDx a vyhodnoceny na falešné positivity. První běh zahrnoval 11 replikátů vzorku s mutací genu 2 plus jeden blank. Druhý běh zahrnoval 11 replikátů vzorku s mutací genu 1 plus jeden blank. Knihovna vzorků s mutací genu 2 byla sekvenována jako první, potom následoval běh sekvenování knihovny vzorku s mutací genu 1, a potom ještě jeden běh sekvenování knihovny vzorku s mutací genu 2. Pokud by u běhu pouze s mutací genu 1 byly pozorovány mutace genu 2, nebo naopak, znamenalo by to přenos.

Nebyla vykázána žádná falešná pozitivita (0/24, 0 %) v důsledku přenosu *mezi jamkami*. Všechny očekávané mutace byly detekovány. Nebyla vykázána žádná falešná pozitivita (0/24, 0 %) v důsledku přenosu *mezi běhy*. Všechny očekávané mutace byly detekovány. Bylo vykázáno nula falešných pozitivit (0/48, 0 %) způsobených přenosem *celkově* (přenos mezi jamkami plus přenos mezi běhy).

Charakteristiky germinální účinnosti

Zde popsané studie analyzovaly data sekvenování pomocí modulu Germline Variant, kromě studií používajících panel s jedním genem, kde byl použit specifický modul pro daný rozbor.

Přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti přístroje MiSeqDx u sady reagentů Sada reagentů MiSeqDx Reagent Kit v3 a vysoce kvalitní DNA byla provedena následující studie. Studie využila reprezentativní rozbor určený k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech s využitím 150 amplikonů. Chromozom Y neobsahuje spolehlivé oblasti a nebyl vyhodnocován. Dvanáct unikátních vzorků použitých v této studii je z jedné rodiny – dva rodiče a 10 dětí – často sekvenované řadou laboratoří a metodami sekvenování. Pět vzorků je od žen a sedm od mužů. Všechny vzorky byly testovány na duplikacích. Pro SNV, inzerce a delece byla určena přesnost porovnáním dat ze studie s dobře charakterizovanou referenční databází. Sekvence referenční databáze (Platinum Genomes version 2016-01) byla odvozena z kombinace několika metod sekvenování, veřejně dostupných dat a dřívějších informací. Není-li uvedeno jinak, byly spolehlivé genomové oblasti definovány na základě této referenční metody. Celkem byl běh u vzorků proveden osmkrát, tabulky pro prokázání přesnosti jsou založeny na datech z prvního běhu.

Tabulka 1 uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Kombinují se tři typy variant (SNV, inzerce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a inzercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 1 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx na každý vzorek

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet variant	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet přiřazení TN	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

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet variant	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet přiřazení TN	PPA	NPA	OPA
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

Reprezentativní rozbor se skládal ze 150 ampliconů zahrnujících různý obsah genomu. Obsah GC ampliconů se pohyboval v rozmezí 26–87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Kompilací dat na každý amplicon ([Tabulka 2](#)) byl určen dopad obsahu genomu na procento správných přiřazení. Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytují nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %. Varianty bez přiřazení se vyskytují v případě, kdy při přiřazení variant nejsou splněny podmínky jednoho nebo více filtrů (např. nedostatečné pokrytí).

Z osmi variant FN z [Tabulka 2](#) mělo sedm inzerci o délce 1 bp na ampliconu 111, který obsahuje i homopolymer PolyA a kde obsah GC je 0,29. Zbývající 1 FN (nesprávné přiřazení) bylo způsobeno očekávanou heterozygotní SNV na ampliconu 125 s obsahem GC 0,68, která byla přiřazena jako homozygotní varianta. Frekvence varianty SNV byla 0,71, tedy víc než 0,70, což je prahová hodnota pro klasifikaci jako homozygotní varianta. Amplicon s nejnižším % správných přiřazení (98,2 %) byl amplicon 17, který měl 40 variant bez přiřazení a obsahoval opakování AT a obsah GC 27 %.

Tabulka 2 Přesnost přístroje MiSeqDx na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	—	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	—	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	—	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
24	4	15688604	15688681	78	78	—	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	—	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	—	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	—	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	—	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
51	8	1817312	1817394	83	83	—	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	—	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	—	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	—	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	—	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	—	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	—	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	—	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	—	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	—	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	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	—	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	—	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	—	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	—	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	—	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	—	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	—	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	—	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	—	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	—	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	—	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	—	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	—	0,55	0	0	0	—
149	Y	2655519	2655609	91	0	—	0,48	0	0	0	—
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	—

Varianty bez přiřazení jsou shrnuty v [Tabulka 3](#). V tabulce jsou uvedeny konkrétní filtry, které ke stavu bez přiřazení vedly. Inzerce na amplikonu 111 byla filtrována u devíti ze 16 výskytů, zbývajících sedm výskytů bylo přiřazeno jako referenční a jde tudíž o FN.

Tabulka 3 Souhrn variant bez přiřazení

Č. ampliconu	Chr:Pos	Varianta	Odpovídající obsah ampliconu	Filtr	Chybějící varianty	Očekávané varianty	Přiřazení FN
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Filtr opakování. Varianta je filtrována, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá sekvence varianty nebo její část. Vyžadováno je minimálně devět opakování v referenci a počítají se pouze opakování s délkou do 5 bp.

Výsledky sekvenování vzorku NA12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 ampliconů bylo 92 ampliconů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 ampliconů mělo částečné překrytí a 17 ampliconů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Výsledkem bylo 10 000 souřadnic na replikát pro porovnání. Nevariantní přiřazení báze byla porovnána s referenční sekvencí lidského genomu build 19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 4](#).

Tabulka 4 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx pro vzorek NA12878 s databází NIST

Vzorek	Počet ampliconů	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet přiřazení TN	Celkový počet přiřazení FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

U vzorků se dále analyzovala přiřazení malých inzercí a delecí (indelů) ([Tabulka 5](#)). V některých případech byl indel společný pro dva nebo více vzorků, jak je vidět ve sloupci Celkový počet replikátů vzorku s indelem. Výsledky pro oba replikáty 12 platných vzorků jsou uvedeny v [Tabulka 5](#). Celkem se vyskytlo 71 indelů o délce 1–24 bp v případě inzercí a 1–25 bp v případě delecí. U 69 indelů bylo zjištěno procento pozitivní shody 100 %. Jedna delece (amplicon 64; delece 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) neměla žádná správná přiřazení, protože každá z těchto variant byla kvůli filtru R5x9 bez přiřazení. Proto nebylo možné vypočítat PPA, které vylučuje případy bez přiřazení. Další indel, inserce 1 bp (chr17 39589692 C>CA na ampliconu 111), také neměl žádná správná přiřazení, protože devět variant bylo kvůli filtru R5x9 bez přiřazení a sedm mělo přiřazení FN.

Tabulka 5 Souhrn detekce indelů přístrojem MiSeqDx

Amplikon	Chromozom	Polize	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu amplikonu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
1	1	36450544	93	Delece 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Delece 3 bp	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Inzerce 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Delece 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Inzerce 5 bp	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Inzerce 3 bp	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Inzerce 7 bp	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Delece 6 bp	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Inzerce 5 bp	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Inzerce 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Inzerce 2 bp	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Delece 23 bp	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Inzerce 9 bp	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Delece 1 bp	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Delece 8 bp	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Inzerce 11 bp	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Delece 4 bp	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Inzerce 8 bp	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Delece 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Delece 3 bp	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Delece 25 bp	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Delece 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Inzerce 1 bp	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Delece 4 bp	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Inzerce 1 bp	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Delece 4 bp	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Delece 11 bp	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100

Amplikon	Chromozom	Pozice	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu amplikonu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
52	8	24811064	90	Delece 1 bp	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Inzerce 4 bp	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Inzerce 4 bp	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Delece 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Delece 3 bp	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Delece 16 bp	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Delece 2 bp	TAC>T	10	10	0	0	—
68	11	30177690	70	Inzerce 2 bp	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Inzerce 8 bp	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Delece 8 bp	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Delece 2 bp	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Inzerce 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Inzerce 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Inzerce 4 bp	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Delece 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Delece 22 bp	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Inzerce 4 bp	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Delece 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Delece 5 bp	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Delece 6 bp	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Delece 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Inzerce 3 bp	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Inzerce 4 bp	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Delece 7 bp	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Delece 1 bp	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Inzerce 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Inzerce 4 bp	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Inzerce 1 bp	C>CA	16	9	7	0	0

Amplikon	Chromozom	Pozice	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu ampliconu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
112	17	39589739	84	Inzerce 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Delece 4 bp	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Delece 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Inzerce 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Inzerce 3 bp	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Delece 2 bp	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Delece 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Inzerce 5 bp	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Inzerce 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Delece 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Inzerce 11 bp	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Delece 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Delece 5 bp	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Inzerce 6 bp	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Inzerce 5 bp	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Delece 10 bp	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reprodukovatelnost

U přístroje MiSeqDx byly provedeny dvě studie pro vyhodnocení reprodukovatelnosti u buněčných linií (studie 1 a 2) nebo u krve zbavené leukocytů a obohacené buněčnými liniemi (studie 2). U studie 1 bylo použito několik přístrojů. U studie 2 byla využita různá pracoviště.

Studie 1

Reprodukovatelnost přístroje MiSeqDx byla určena pomocí dvou přístrojů, dvou operátorů a dvou šarží reagensií během celkem osmi běhů. Reprezentativní rozbor, vzorky a referenční metoda se shodují s rozbohem, vzorky a metodou popsanou u studie přesnosti.

Výsledky jsou u každého přístroje uvedeny pro jednotlivé amplikony (Tabulka 6) a prokazují reprodukovatelnost přiřazení u jednotlivých přístrojů. Procento správných přiřazení zahrnovalo jak nesprávná přiřazení, tak varianty bez přiřazení (u přiřazení varianty nebyly splněny podmínky jednoho nebo více filtrů). Přístroje vygenerovaly podobné počty variant bez přiřazení a nesprávných přiřazení v závislosti na konkrétním amplikonu.

Tabulka 6 Studie reprodukovatelnosti výsledků přístroje MiSeqDx na jednotlivých přístrojích (na úrovni amplikonu)

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	—	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	—	0,43	8928	0	0	8928	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	—	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	—	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	—	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	—	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	—	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	—	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	—	0,42	7968	0	0	7968	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	—	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	—	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	—	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	—	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	—	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	—	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	—	0,42	8160	0	0	8160	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	—	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	—	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	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	—	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	—	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	—	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	—	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	—	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	—	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	—	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	—	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	—	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG (4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	—	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	—	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	—	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	—	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	—	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Výsledky studie reprodukovatelnosti byly analyzovány u jednotlivých operátorů s využitím frekvence variant ([Tabulka 7](#)). Tato analýza prokázala, že frekvence variant byly u jednotlivých operátorů konzistentní. Uvedeny jsou střední frekvence variant +/- 1 (směrodatná odchylka).

Tabulka 7 Výsledky přístroje MiSeqDx u jednotlivých operátorů

Rozsah frekvencí variant	Počet unikátních variant	Celkový počet variant analyzovaných operátorem 1	Celkový počet variant analyzovaných operátorem 2	Střední (SD) vykázaná frekvence variant u operátora 1	Střední (SD) vykázaná frekvence variant u operátora 2
Homozygotní (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozygotní (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Zobrazené výsledky studie reprodukovatelnosti pro jednotlivé vzorky jsou zkombinovány ze všech osmi běhů (Tabulka 8). Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny. Tato analýza prokázala, že výsledky pro varianty byly ve všech vzorcích reprodukovatelné.

Tabulka 8 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx na každý vzorek

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

Data získaná z osmi běhů této studie reprodukovatelnosti podporují tvrzení, že přístroj MiSeqDx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC $\geq 19\%$ (všechny přiřazené báze u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů s obsahem GC 19 % byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 1,1 %)
- Obsah GC $\leq 78\%$ (všechny přiřazené báze u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů s obsahem GC 78 % byly přiřazeny správně a s žádnou variantou bez přiřazení)
- Délky PolyA ≤ 8 (opakování PolyA 8 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyA = 8)
- Délky PolyT ≤ 10 (opakování PolyT 10 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyT = 10)
- Délky PolyG ≤ 7 (opakování PolyG 7 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyG = 7)
- Délky PolyC ≤ 6 (opakování PolyC 6 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 576 z 576 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyC = 6)
- Délky opakování dinukleotidů $\leq 11x$ (všechny přiřazené báze u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů s opakováním dinukleotidů 11x byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,5 %)
- Délky opakování trinukleotidů $\leq 5x$ (všechny přiřazené báze u 192 ze 192 sekvenovaných amplikonů s opakováním trinukleotidů 5x byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,5 %)
- Inzerce o délce 24 bp nebo méně a delece o délce 25 bp nebo méně
 - Inzerce 24 bp byly přiřazeny správně u 192 ze 192 vzorků
 - Delece 25 bp byly přiřazeny správně u 223 vzorků a nesprávně přiřazeny u 1 vzorku z 224 vzorků

Studie 2

Studie přenosu mezi pracovišti, provedená s reprezentativním rozbohem Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay, zahrnovala podskupinu klinicky významných genetických variací *CFTR* analyzovaných softwarem MiSeq Reporter pomocí cíleného pracovního postupu platformy MiSeqDx pro sekvenování DNA. Zaslepená studie byla provedena na 3 zkušebních pracovištích se 2 operátory na každém pracovišti. Dva dobře charakterizované panely 46 vzorků byly na každém pracovišti testovány každým operátorem na celkem 810 přiřazení na jedno pracoviště. Panely obsahovaly směs genomové DNA z buněčných linií se známými variantami v genu *CFTR* a krve zbavené leukocytů a obohacené buněčnými liniemi se známými variantami v genu *CFTR*. Krevní vzorky

měly umožnit zahrnutí kroků extrakce používaných k přípravě gDNA, která slouží jako primární vstup pro pracovní postup rozboru. Úspěšnost vzorků, definovaná jako počet vzorků splňujících metriky QC při prvním pokusu, byla 99,88 %. Všechny výsledky testů jsou založeny na počátečním testování.

Tabulka 9 Přehled výsledků studie reprodukovatelnosti provedené reprezentativním rozбором MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Panel	Číslo vzorku	Genotyp vzorku	Varianty	Celkový počet přiřazení na pracoviště	Pozitivní shodná přiřazení (varianty)			Negativní shodná přiřazení (divoký typ)			Počet nesprávných přiřazení	Počet variant bez přiřazení	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)
					Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3	Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Číslo vzorku	Genotyp vzorku	Varianty	Celkový počet přiřazení na pracoviště	Pozitivní shodná přiřazení (varianty)			Negativní shodná přiřazení (divoký typ)			Počet nesprávných přiřazení	Počet variant bez přiřazení	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)
					Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3	Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3					
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nepřít.	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
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	—	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Číslo vzorku	Genotyp vzorku	Varianty	Celkový počet přiřazení na pracoviště	Pozitivní shodná přiřazení (varianty)			Negativní shodná přiřazení (divoký typ)			Počet nesprávných přiřazení	Počet variant bez přiřazení	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)
					Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3	Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3					
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	—	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	—	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
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	—	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Číslo vzorku	Genotyp vzorku	Varianty	Celkový počet přiřazení na pracoviště	Pozitivní shodná přiřazení (varianty)			Negativní shodná přiřazení (divoký typ)			Počet nesprávných přiřazení	Počet variant bez přiřazení	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)
					Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3	Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3					
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	—	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	—	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	—	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	—	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	—	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	—	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44

Panel	Číslo vzorku	Genotyp vzorku	Varianty	Celkový počet přiřazení na pracoviště	Pozitivní shodná přiřazení (varianty)			Negativní shodná přiřazení (divoký typ)			Počet nesprávných přiřazení	Počet variant bez přiřazení	Pozitivní shoda (%)	Negativní shoda (%)	Celková shoda (%)
					Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3	Pracoviště 1	Pracoviště 2	Pracoviště 3					
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	1812-1G>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	—	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	—	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Celkem				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Umístění divokého typu odpovídající variantě N1303K pro jeden replikát mělo za následek variantu bez přiřazení vzhledem k nedostatečnému pokrytí.

² Jeden replikát vzorků 5 a 75 měl míru přiřazení 0 %. Z dalšího šetření vyplynulo, že vzorek možná nebyl před přípravou knihovny přidán na desku vzorků, protože objemy vzorků zbylé ve zkumavkách odpovídaly stavu, kdy by nebylo nic odebráno.

³ Z důkazů plyne, že vzorky 9 a 10 byly pravděpodobně před přípravou knihovny zaměněny operátorem.

⁴ Umístění divokého typu odpovídající variantě M1V pro jeden replikát každého ze dvou vzorků mělo za následek variantu bez přiřazení vzhledem k nedostatečnému pokrytí.

Charakteristiky somatické účinnosti

Zde popsané studie analyzovaly data sekvenování pomocí modulu Somatic Variant, kromě studií používajících panel se dvěma geny, kde byl použit specifický modul pro daný rozbor.

Přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti přístroje MiSeqDx u DNA extrahované ze vzorků FFPE byly provedeny tři studie.

Studie 1

Studie využila reprezentativní rozbor určený k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech s využitím 150 amplikonů. Chromozom Y neobsahuje spolehlivé oblasti a nebyl vyhodnocován. Pět unikátních vzorků použitých v této studii je z jedné rodiny – dva rodiče a tři děti – často sekvenované řadou laboratoří a metodami sekvenování. Tři vzorky jsou od žen a dva od mužů. Před extrakcí DNA pro studii byly všechny vzorky fixované formalínem a zalité do parafínu. Vzorek GM12877 byl na úrovni DNA zředen vzorkem GM12878 a vznikl tak vzorek GM12877-D pro vytvoření sady variant s frekvencemi přibližně 5 % a 10 %. Všechny vzorky byly testovány na duplikacích, kromě GM12877-D, který byl testován na pěti replikátech. Pro SNV, inzerce a delece byla určena přesnost porovnáním dat ze studie s dobře charakterizovanou referenční databází. Sekvence referenční databáze (Platinum Genomes version 2016-01) byla odvozena z kombinace několika metod sekvenování, veřejně dostupných dat a dřívějších informací. Není-li uvedeno jinak, byly spolehlivé genomové oblasti definovány na základě této referenční metody. Celkem byl běh u vzorků proveden osmkrát. Tabulky pro prokázání přesnosti jsou založeny na datech z prvního běhu.

Tabulka 10 uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Kombinují se tři typy variant (SNV, inzerce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a inzercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 10 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx s referenčními daty u 6 dobře charakterizovaných vzorků

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet variant	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet přiřazení TN	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

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet variant	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet přiřazení TN	PPA	NPA	OPA
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

¹ Varianty s frekvencí vyšší než 20 %.

² Varianty s frekvencí nižší než 20 %.

K pokrytí různého obsahu genomu bylo určeno 150 ampliconů. Obsah GC ampliconů se pohyboval v rozmezí 26–87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. V rozboru bylo použito 6 unikátních vzorků. Kompilací dat na každý amplicon (Tabulka 11) byl určen dopad obsahu genomu na procento správných přiřazení. Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytují nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %. Varianty bez přiřazení se vyskytují v případě, kdy při přiřazení variant nejsou splněny podmínky jednoho nebo více filtrů (např. nedostatečné pokrytí). Nevyskytla se žádná nesprávná přiřazení. Počet variant bez přiřazení se mezi jednotlivými amplicony značně lišil. Nejvýraznějšími prediktory variant bez přiřazení byl obsah GC a několik interakcí s obsahem GC. 2040/2580 (79 %) variant bez přiřazení bylo způsobeno nesplněním podmínek pokrytí. Většinu variant bez přiřazení způsobily amplicony s obsahem GC větším než 78 %. Reprezentativní amplicon s obsahem GC 78 % měl celkem 675 variant bez přiřazení. Reprezentativní amplicon s 87 % měl celkem 1365 variant bez přiřazení. Pokrytí lze zvýšit snížením počtu vzorků vložených do průtokové kyvety, což umožní detekci na ampliconech s vysokým obsahem GC.

Tabulka 11 Údaje o přesnosti na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	—	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	—	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	—	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	—	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	—	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	—	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	—	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	—	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	—	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	—	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	—	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	—	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	—	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	—	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	—	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	—	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	—	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	—	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	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	—	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	—	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	—	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
118	18	6980478	6980568	91	91	—	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	—	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	—	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	—	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	—	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	—	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	—	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	—	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	% správných přiřazení
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	—	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	—	0,55	0	0	0	—
149	Y	2655519	2655609	91	0	—	0,48	0	0	0	—
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	—

Varianty bez přiřazení jsou shrnuty v [Tabulka 12](#). V tabulce jsou uvedeny konkrétní filtry, které ke stavu bez přiřazení vedly.

Tabulka 12 Souhrn variant bez přiřazení

Č. amplikonu	Chr:Pos	Varianta	Odpovídající obsah amplikonu	Filtr	Chybějící varianty	Očekávané varianty
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87% GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ LowDP: Nízké pokrytí. Varianta je filtrována, pokud hloubka nejméně jednoho fondu na dané pozici je menší než 900.

² R3x6: Filtr opakování. Varianta je filtrována, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá sekvence varianty nebo její část. Vyžadováno je minimálně šest opakování v referenci a počítají se pouze opakování s délkou do 3 bp.

Výsledky sekvenování vzorku se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 amplikonů bylo 92 amplikonů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 amplikonů mělo částečné překrytí a 17 amplikonů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Výsledkem bylo 10 000 souřadnic na replikát pro porovnání. Nevariantní přiřazení báze se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 13](#).

Tabulka 13 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx s referencí NIST pro vzorek GM12878

Vzorek	Počet amplikonů	Průměrná míra přiřazení	Celkový počet přiřazení variant TP	Celkový počet přiřazení variant FN	Celkový počet přiřazení TN	Celkový počet přiřazení FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Pět neřaděných vzorků bylo dále analyzováno na přiřazení malých inzercí a delecí (indelů) (Tabulka 14). V některých případech byl indel společný pro dva nebo více vzorků, jak je vidět ve sloupci Celkový počet replikátů vzorku s indelem. Výsledky pro oba replikáty pěti vzorků jsou uvedeny v Tabulka 14. Celkem se vyskytlo 71 indelů o délce 1–24 bp v případě inzercí a 1–25 bp v případě delecí. U 68 indelů bylo zjištěno procento pozitivní shody 1. Tři vložení a delece neměly žádná správná přiřazení, protože každá z těchto variant byla kvůli filtru R3x6 bez přiřazení. Hodnota PPA, kde jsou varianty bez přiřazení vyloučeny, proto nemohla být vypočítána. Uvedené tři varianty byly delece 1 bp (chr8 24811064 AG>A); delece 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) a inserce 1 bp (chr17 39589692 C>CA).

Tabulka 14 Souhrn detekce indelů přístrojem MiSeqDx

Amplikon	Chromozom	Pozice	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu amplikonu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
1	1	36450544	93	Delece 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Delece 3 bp	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Inzerce 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Delece 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Inzerce 5 bp	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Inzerce 3 bp	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Inzerce 7 bp	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Delece 6 bp	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Inzerce 5 bp	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Inzerce 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Inzerce 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Delece 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Inzerce 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Delece 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Delece 8 bp	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Inzerce 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Delece 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Inzerce 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Delece 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Delece 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100

Amplikon	Chromozom	Pozice	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu amplikonu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
39	6	32986905	95	Delece 25 bp	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Delece 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Inzerce 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Delece 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Inzerce 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Delece 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Delece 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Delece 1 bp	AG>A	15	15	0	0	—
53	8	76518677	67	Inzerce 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Inzerce 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Delece 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Delece 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Delece 16 bp	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Delece 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Inzerce 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Inzerce 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Delece 8 bp	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Delece 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Inzerce 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Inzerce 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Inzerce 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Delece 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Delece 22 bp	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Inzerce 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Delece 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Delece 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Delece 6 bp	CAAAATT>C	11	0	0	11	100

Amplikon	Chromozom	Pozice	Velikost analyzovaného fragmentu	Typ a délka indelu amplikonu	Indel	Celkový počet replikátů vzorku s indelem	Počet variant bez přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení indelů	Celkový počet správných přiřazení indelů	PPA
96	15	77879862	95	Delece 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Inzerce 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Inzerce 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Delece 7 bp	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Delece 1 bp	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Inzerce 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Inzerce 4 bp	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Inzerce 1 bp	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Inzerce 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Delece 4 bp	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Delece 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Inzerce 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Inzerce 3 bp	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Delece 2 bp	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Delece 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Inzerce 5 bp	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Inzerce 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Delece 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Inzerce 11 bp	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Delece 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Delece 5 bp	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Inzerce 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Inzerce 5 bp	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Delece 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Studie 2

Tato studie využívala vzorky tkáně FFPE s kolorektálním karcinomem z banky a reprezentativní rozbor dvou genů, který byl porovnán s referenční metodou, obousměrné Sangerovo sekvenování (Sanger). Z celkem 1183 subjektů mělo 441 subjektů platné výsledky Sangerova sekvenování a reprezentativního rozboru. Při vyhodnocení na úrovni subjektu (Tabulka 15) bylo 230 ze 441 subjektů pozitivních při Sangerově sekvenování (mutace detekované Sangerovým sekvenováním). Z nich bylo 227 pozitivních v reprezentativním rozboru. Zbývajících 211 ze 441 subjektů bylo při Sangerově sekvenování negativních (Sangerovým sekvenováním nebyly detekovány žádné mutace). Z nich bylo 206 negativních v reprezentativním rozboru. Výsledkem je procento pozitivní shody (PPA) 98,7 % a procento negativní shody (NPA) 97,6 % (Tabulka 15).

Tabulka 15 Procento pozitivní a negativní shody výsledků na úrovni subjektu

Reprezentativní rozbor	Sanger		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
Pozitivní	227 ¹	5	232
Negativní	3 ²	206	209
Celkem	230	211	441

Účinnost Shrnutí		
Shoda Statistika	Bodový odhad	Přesný 95% CI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

¹Pro výsledky v rámci subjektu pro všechny mutace bylo 224 přesných shod. U dvou subjektů přístroj MiSeqDx detekoval mutaci detekovanou Sangerovým sekvenováním a jednu další mutaci. U jednoho subjektu detekovaly přístroj MiSeqDx a Sangerovo sekvenování různé mutace.

²Jeden subjekt měl dvě mutace detekované Sangerovým sekvenováním. Dva subjekty měly jednu mutaci detekovanou Sangerovým sekvenováním.

Studie 3

Tato studie vyhodnocuje knihovny DNA připravené ze vzorků FFPE různých typů tkání. Celkem jde o 109 vzorků FFPE osmi různých tkání (tlusté střevo, vaječník, pankreas, nadledvina, močový měchýř, játra, štítná žláza a prs s nejméně 11 vzorky FFPE reprezentujícími jednotlivé typy tkání). Tkáň nadledviny obsahovala metastázy nádoru jícnu, plic a tlustého střeva. Ostatní tkáně měly primární nádory. Tato studie využila reprezentativní rozbor určený k vyhledání 26 genů zahrnujících 21 577 bází na 17 různých chromozomech. U celkem šesti různých genů (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* a *BRAF*) bylo provedeno Sangerovo sekvenování, kterému byly u každého nádoru podrobeny 1–3 geny na základě očekávané prevalence somatických mutací daného nádoru. Z výsledků Sangerova sekvenování vyplynulo 39 somatických mutací SNV ve 33 ze 109 vzorků FFPE. Přístroj MiSeqDx identifikoval 36 somatických mutací SNV ve 32 ze 109 vzorků FFPE s jedním falešně negativním případem a dvěma pozicemi variant bez přiřazení. PPA bylo 97,3 %. Přístroj MiSeqDx identifikoval 78 975 referenčních bází ve 109 vzorcích FFPE s 29 falešně pozitivními případy vzhledem k Sangerovu sekvenování a 3 416 bez přiřazení. NPA bylo 99,9 %. Delece dvou bází se u obou metod shodovala. [Tabulka 16](#) shrnuje výsledky podle typu tkáně.

Tabulka 16 Procento pozitivní a negativní shody podle typu tkáně

Typ tkáně	Počet vzorků	Celkový počet variant	Celkový počet variant TP	Celkový počet variant FN	Celkový počet přiřazení TN	Celkový počet přiřazení FP	Celkový počet variant bez přiřazení	PPA	NPA
Nadledvina	16	6	4	1	11823	2	607	80	> 99,9
Močový měchýř	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Prs	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Tlusté střevo	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Játra	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Vaječník	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Pankreas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Štítná žláza	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Celkem	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	> 99,9

Reprodukovatelnost

Pro vyhodnocení reprodukovatelnosti přístroje MiSeqDx u DNA extrahované ze vzorků FFPE byly provedeny dvě studie. U studie 1 bylo použito několik přístrojů. U studie 2 byla využita různá pracoviště.

Studie 1

Reprodukovatelnost přístroje MiSeqDx byla určena pomocí dvou přístrojů, na kterých dva zkušení operátoři provedli celkem osm běhů. Reprezentativní rozbor, obsah genomu amplikonu, vzorky a referenční metody jsou stejné jako u studie přesnosti 1 výše. Výsledky jsou u každého přístroje uvedeny pro jednotlivé amplikony ([Tabulka 17](#)) a prokazují reprodukovatelnost přiřazení u jednotlivých přístrojů. Procento správných přiřazení zahrnovalo jak nesprávná přiřazení, tak varianty bez přiřazení (u přiřazení varianty nebyly splněny podmínky jednoho nebo více filtrů). Přístroje vygenerovaly podobné počty variant bez přiřazení v závislosti na konkrétním amplikonu. U přístroje MiSeqDx 1 bylo pozorováno jedno nesprávné přiřazení v rámci oblasti spolehlivosti definované referenčním standardem Platinum Genomes. Toto nesprávné přiřazení bylo falešně pozitivní přiřazení varianty inzerce v amplikonu 64 při vyhledávání chromozomu 10 na pozicích 55892599 až 55892687. Amplikon měl opakování dinukleotidu 11.

Tabulka 17 Studie reprodukovatelnosti výsledků přístroje MiSeqDx na jednotlivých přístrojích (na úrovni amplikonu)

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
10	2	85	81	—	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	—	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	—	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	—	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	—	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	—	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	—	0,44	4380	0	0	4380	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	—	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	—	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	—	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	—	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	—	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	—	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	—	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	—	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	—	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	—	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	—	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	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	—	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	—	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	—	0,27	3780	0	0	780	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x 2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	—	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	—	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	—	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	—	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	—	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	—	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0

Amplikon	Chromozom	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení	Celkový počet správných přiřazení	Celkový počet nesprávných přiřazení	Celkový počet variant bez přiřazení
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	—	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	—	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	—	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	—	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	—	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Výsledky studie reprodukovatelnosti byly analyzovány u jednotlivých operátorů s využitím frekvence variant ([Tabulka 18](#)). Tato analýza prokázala, že frekvence variant byly u jednotlivých operátorů konzistentní. Uvedeny jsou střední frekvence variant +/- 1 (směrodatná odchylka).

Tabulka 18 Výsledky přístroje MiSeqDx u jednotlivých operátorů

Rozsah frekvencí variant	Počet unikátních variant	Celkový počet variant analyzovaných operátorem 1	Celkový počet variant analyzovaných operátorem 2	Střední (SD) vykázaná frekvence variant u operátora 1	Střední (SD) vykázaná frekvence variant u operátora 2
Vysoká frekvence (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Střední frekvence (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Nízká frekvence (3–7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Zobrazené výsledky studie reprodukovatelnosti pro jednotlivé vzorky jsou zkombinovány ze všech osmi běhů (Tabulka 19). Detekce se hodnotí samostatně pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece. Referenční pozice jsou vyloučeny. Tato analýza prokázala, že výsledky pro varianty byly ve všech vzorcích reprodukovatelné.

Tabulka 19 Shoda výsledků přiřazení báze přístroje MiSeqDx na každý vzorek

Vzorek	SNV				Inzerce				Delece			
	Celkový počet	Celkový počet TP	Celkový počet FP	Celkový počet FN	Celkový počet	Celkový počet TP	Celkový počet FP	Celkový počet FN	Celkový počet	Celkový počet TP	Celkový počet FP	Celkový počet FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹ Varianty s frekvencí vyšší než 20 %.

² Varianty s frekvencí nižší než 20 %.

Data získaná z 8 běhů této studie reprodukovatelnosti podporují tvrzení, že přístroj MiSeqDx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC \geq 19 % (všechny přiřazené báze u 120 ze 120 sekvenovaných amplikonů s obsahem GC 19 % byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 3,4 %)
- Obsah GC \leq 73 % (všechny přiřazené báze u 120 ze 120 sekvenovaných amplikonů s obsahem GC 73 % byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,1 %)
- Délky PolyA \leq 8 (opakování PolyA 8 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 120 ze 120 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyA = 8)
- Délky PolyT \leq 10 (opakování PolyT 10 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 120 ze 120 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyT = 10)
- Délky PolyG \leq 6 (opakování PolyG 6 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 720 ze 720 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyG = 6)
- Délky PolyC \leq 6 (opakování PolyC 6 nukleotidů bylo přiřazeno správně u 359 ze 360 sekvenovaných amplikonů obsahujících PolyC = 6, s jednou variantou bez přiřazení)

- Délky opakování dinukleotidů $\leq 4x$ (všechny přiřazené báze u 600 ze 600 sekvenovaných amplikonů s opakováním dinukleotidů 4x byly přiřazený správně s mírou variant bez přiřazení 0,4 %)
- Délky opakování trinukleotidů $\leq 5x$ (všechny přiřazené báze u 120 ze 120 sekvenovaných amplikonů s opakováním trinukleotidů 5x byly přiřazený správně s mírou variant bez přiřazení 1,9 %)
- Inzerce o délce 24 bp nebo méně a delece o délce 25 bp nebo méně
 - Inzerce 24 bp byly přiřazený správně u 120 ze 120 vzorků
 - Delece 25 bp byly přiřazený správně u 182 vzorků a vykázány jako varianty bez přiřazení u 2 vzorků ze 184

Studie 2

K vyhodnocení reprodukovatelnosti reprezentativního rozboru dvou genů, popsaného ve studii přesnosti 2, byla provedena externí studie na třech testovacích pracovištích (se dvěma operátory na každém pracovišti), pomocí jedné šarže reagentů a ve třech po sobě jdoucích testovacích dnech. Testování bylo prováděno se šesti panely dobře charakterizovaných vzorků genomové DNA z klinických vzorků FFPE nebo buněčných linií. Každý panel tvořilo 10 členů, celkem tedy 60 členů ve všech panelech.

Těchto 60 členů panelů představovaly duplikace čtyř unikátních vzorků divokého typu (pro mutace panelů), 12 unikátních vzorků mutací (s jednou mutací) připravených na vysoké i nízké frekvenci mutací a dva unikátní vzorky mutací (s jednou mutací) připravené pouze na nízké frekvenci mutací. Každý unikátní případ na úrovni vzorku / frekvence mutací (v každém běhu testováno na duplikacích) měl 36 možných výsledků (2 replikáty \times 2 operátoři \times 3 dny \times 3 pracoviště), pokud by byly všechny výsledky platné.

Hodnota procenta očekávaných přiřazení (Percent Expected Call, PEC) ve všech pozitivních a negativních variantách byla vyhodnocena porovnáním výsledků reprezentativního rozboru s očekávanými výsledky mutací (očekávaná mutace detekována nebo nedetekována) v každém vzorku. PEC se počítá jako 100 % krát počet očekávaných přiřazení děleno počtem pokusů o přiřazení. Oboustranný 95% interval spolehlivosti se počítá pomocí Wilsonovy metody hodnocení.

Ze všech pracovišť dohromady byla úspěšnost vzorků $\geq 94,7$ % u prvního běhu vzorku nebo u vzorků testovaných při běžích, které byly při prvním průchodu platné. PEC na úrovni mutací u všech vzorků s mutacemi bylo 99,6 % (905/909) (95% interval spolehlivosti; 98,9, 99,8). Počet pokusů o přiřazení ve všech 56 mutacích panelů (bez ohledu na to, zda detekovaná mutace byla nebo nebyla očekávána) pro všechny platné vzorky byl 58 856 (56 \times 1051). Z těchto 58 856 pozorování na úrovni mutací bylo jen šest případů, kdy byly pozorované a očekávané výsledky v rozporu. PEC na úrovni mutací u všech pozitivních a negativních variant ze všech mutací a členů panelů divokého typu dohromady bylo 99,99 % (58 850/58 856).

Analytická citlivost (mez blanku (LoB) a mez detekce (LoD))

Tato studie sloužila k ověření mezní hodnoty rozboru a určení meze detekce (Limit of Detection, LoD) přístroje MiSeqDx pomocí reprezentativního panelu. Stručně řečeno, dobře charakterizované buněčné linie Platinum Genome GM12878 a GM12877 byly fixovány formalínem a zality do parafínu a poté následovala extrakce DNA. Vzorek GM12878 byl zředěn vzorkem GM12877 tak, aby frekvence varianty u sedmdesáti variant (52 SNV, devět inzercí a devět delecí) byla přibližně 0,05. Oba vzorky DNA byly testovány dvěma operátory pomocí dvou přístrojů a dvou šarží reagensů při celkem 10 běžích sekvenování MiSeqDx. Výsledkem bylo 40 replikátů každé varianty GM12878 a 60 replikátů každé odpovídající souřadnice divokého typu GM12877 pro každou šarží reagensů. LoB a LoD se vypočítaly klasickou metodou pomocí neparametrické možnosti uvedené v CLSI EP17-A2. LoB a LoD se vypočítaly samostatně pro SNV, inzerci a delece, a to sloučením frekvencí variant daného typu varianty do fondu. Chyba I. typu byla definovaná jako 0,01 a chyba II. typu jako 0,05.

U LoB se frekvence variant sloučených do fondu seřadily od nejnižší po nejvyšší a pro každý typ varianty se vypočítala 99. pozice každé šarže reagensů ([Tabulka 20](#)). Software MiSeqDx využívá ke stanovení kvalitativní detekce variant mezní hodnotu (účinnou LoB) frekvence variant 0,026. Vypočítané meze blanku prokázaly, že tato mezní hodnota nemá za následek chybu I. typu větší než 0,01.

Tabulka 20 Mez blanku

Typ varianty	Celkový počet frekvencí variant	LoB – šarže reagensů 1 (%)	LoB – šarže reagensů 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Inzerce	540	0,79	0,60
Delece	540	0,96	0,84

U LoD se vypočítalo procento frekvencí jednotlivých mutací pro každou šarží reagensů a každý typ varianty pod mezní hodnotou 0,026 ([Tabulka 21](#)). Protože procenta byla nižší než 5% chyba II. typu (0,05), jako LoD se vypočítal medián kombinovaných frekvencí variant ([Tabulka 21](#)). Za LoD každého typu varianty se považovala větší ze dvou hodnot vypočítaných pro dvě šarže reagensů: 5,45 % pro SNV, 4,88 % pro inzerci a 5,44 % pro delece.

Tabulka 21 Mez detekce

Šarže reagensů	Typ varianty	Celkový počet frekvencí variant	Počet měření VF < 2,6 %	Procento měření VF < 2,6 %	Mez detekce (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Inzerce	360	0	0,00	4,86
	Delece	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Inzerce	360	0	0,00	4,88
	Delece	360	0	0,00	5,24

Následující studie prokazují charakteristiky účinnosti přístroje MiSeqDx dalším reprezentativním rozbohem cíleným na 56 mutací ve dvou klinicky relevantních rakovinových genech (panel mutací). Panel mutací je konkrétně určen k detekci 56 mutací ve dvou klinicky relevantních rakovinových genech (gen 1 a gen 2). Rozbor současně určuje přítomnost nebo nepřítomnost každé z 56 mutací v jednotlivých sekvenovaných vzorcích. Referenční metodou pro tyto studie bylo obousměrné Sangerovo sekvenování.

Přesnost u jednotlivých šarží

Za účelem vyhodnocení účinnosti přístroje MiSeqDx u různých šarží vyráběných sad reagensů (tvořených reagensy pro kvalifikaci vzorků, přípravu knihovny a sekvenování) byla provedena studie přesnosti u jednotlivých šarží pomocí reprezentativního rozboru dvou genů s využitím panelu pěti smíchaných vzorků FFPE splňujících požadavky na kvalifikaci vzorků. Každý vzorek FFPE obsahoval dvě unikátní mutace: jednu na nižší (cca 8%) úrovni frekvence mutací a jednu na vyšší (cca 14%) úrovni frekvence mutací. Během tří dnů nejdoucích po sobě bylo pomocí tří šarží sad reagensů provedeno dvanáct (12) pozorování každé z pěti směsí vzorků. Celkový počet pozorování pro studii u všech šarží reagensů byl 180 pozorování u všech směsí vzorků a 360 pozorování na všech úrovních frekvence mutací. V rámci všech šarží a všech dnů prokázalo 99,7 % (359/360) pozorování u mutací očekávané výsledky. Jedna mutace na nízké frekvenci byla nesprávně přiřazena jako divoký typ. Pro každou mutaci a úroveň frekvence mutací byla provedena analýza složek rozptylu za účelem vyhodnocení variability systému. Celková směrodatná odchylka byla v intervalu 0,011 až 0,029. Složka směrodatné odchylky ze šarže reagensů byla v intervalu 0 až 0,015.

Historie revizí

Dokument č.	Datum	Popis změny
Dokument č. 200006218 v02	Říjen 2023	Byly aktualizovány odkazy na Local Run Manager pro verzi 4. Bylo aktualizováno označení, do kterého byly přidány podrobnosti o australském sponzorovi. Byly opraveny nesrovnalosti, kde se příbalová informace liší od Zprávy o ověřovací studii přístroje pro MiSeqDx.
Dokument č. 200006218 v01	Květen 2022	Do části „Dodané vybavení a materiály, nevyžadované“ bylo přidáno katalogové číslo sady reagentů MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. V části „Charakteristiky účinnosti“ byly přidány informace o testování pomocí sady MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. V části „Varování a preventivní opatření“ byla odebrána upozornění specifické pro USA.
Dokument č. 200006218 v00	Listopad 2021	První vydání na podporu MOS v4.0 a Local Run Manager v3.0.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejich přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva kterýchkoli třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách viz adresa www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122, Spojené státy
americké
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australský zadavatel

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

Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které jsou uvedeny na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) pro vaši sadu.