

Інструкція з використання для приладів із MOS v4

ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. ЛИШЕ ДЛЯ ЕКСПОРТУ.

Передбачене використання

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

Принципи виконання процедури

Illumina MiSeqDx призначено для таргетного секвенування ДНК людини з використанням витратних матеріалів для секвенування Illumina і бібліотек, приготовлених із геномної ДНК людини, екстрагованої з периферійної цільної крові або FFPE-тканини, за допомогою зареєстрованих і перелічених, дозволених або затверджених реагентів IVD. Приготування бібліотек відбувається через ампліфікацію мішеней і додавання індексів зразків та послідовностей для захоплення. Бібліотеки зразків фіксуються на проточній кюветі та секвенуються на приладі за допомогою хімічної реакції секвенування за допомогою синтезу (SBS). У хімічній реакції SBS використовується метод оборотних термінаторів для виявлення однунуклеотидних основ, тому що їх включено в нитки ДНК, які зростають. Програмне забезпечення Real-Time Analysis (RTA) виконує аналіз зображень і розпізнавання основ, а потім присвоює оцінку якості до кожної основи для кожного циклу секвенування. Після завершення первинного аналізу розпізнавання основ вони обробляються приладом MiSeqDx у процесі вторинного аналізу.

Обробка зазвичай включає демультіплексування, генерування файлів FASTQ, вирівнювання, розпізнавання варіантів і генерування файлів у форматі розпізнавання варіантів (VCF), у яких міститься інформація про варіанти, знайдені в певних позиціях у референсному геномі. У приладі MiSeqDx використовуються різні модулі для вторинного аналізу залежно від робочого процесу.

Завантаження з вибором операційної системи

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

Радіочастотна ідентифікація (radio-frequency identification, RFID) на витратних матеріалах для секвенування дає змогу запобігти використанню реагентів для секвенування RUO в діагностичних прогонах секвенування.

Обмеження процедури

- Використовувати для діагностики *in vitro*.
- Результати, представлені в маркуванні виробу, було отримано за допомогою репрезентативних аналітичних панелей із використанням периферичної цільної крові або клітинних ліній для варіантів зародкової лінії й FFPE-тканини чи клітинних ліній FFPE для соматичних варіантів із застосуванням описаних реагентів і модулів програмного забезпечення. Модулі Germline Variant Module і Somatic Variant Module були розроблені для оцінювання ефективності з репрезентативними аналізами. Технічні характеристики наведено лише для інформування. Наведені валідаційні випробування призначені лише для демонстрації загальних можливостей приладу й не визначають можливості або придатність приладу щодо конкретних вимог. Усі діагностичні тести, розроблені для цього приладу, вимагають проведення повної валідації відносно всіх аспектів його функціонування.
- Обмеження цього приладу передбачають:
 - вихідні дані секвенування ≥ 5 Гб за довжини зчитування 2×150 п. о.;
 - зчитування, що проходять фільтр ≥ 15 мільйонів за довжини зчитування 2×150 п. о.;
 - основи з показником Q вище 30 (Q30) ≥ 80 % за довжини зчитування 2×150 п. о.; щонайменше 80 % основ, які мають оцінки якості за шкалою Phred більше 30, що вказує на точність розпізнавання основ більше 99,9 %.
- Прилад MiSeqDx було валідовано лише для секвенування бібліотек ДНК людини, екстрагованих із периферичної цільної крові або FFPE-тканини. Бібліотеки, згенеровані з інших типів зразків, не можна використовувати в цьому приладі для діагностики *in vitro*. Ефективність цього приладу для секвенування мікробних або вірусних нуклеїнових кислот у зразках пацієнтів не встановлено.
- Прилад MiSeqDx призначено для використання в діагностиці *in vitro* лише із зареєстрованими й переліченими, дозволеними та затвердженими реагентами й аналізами IVD. Обмеження щодо реагентів і технічні характеристики, описані в цій інструкції з використання, базуються на репрезентативних аналізах і модулях програмного забезпечення. Що стосується аналізів IVD, див. інструкцію з використання конкретного аналізу, щоб дізнатися про цільове використання, виявлені варіанти й тип зразка.
- Індели (інсерції, делеції та їхні комбінації) довжиною більше 25 п. о. програмним забезпеченням аналізу не вирівнюються. Отже, програмне забезпечення аналізу не виявляє індели довжиною більше 25 п. о.
- Систему було валідовано на виявлення однонуклеотидних варіантів (single nucleotide variants, SNV), делецій до 25 п. о. та інсерцій до 24 п. о. в разі використання з програмним забезпеченням модулів

Germline Variant (Варіант зародкової лінії) і Somatic Variant (Соматичний варіант). Для розпізнавань соматичних варіантів із частотою 0,05 було виявлено делеції довжиною 25 п. о. та інсерції довжиною 18 п. о.

- Програмне забезпечення аналізу може не вирівнювати зчитування ампліконів з край високим вмістом варіантів. Це призводить до того, що певну область буде зареєстровано як дикий тип. Такий край високий вміст передбачає наведене нижче:
 - зчитування, що містять понад три індели;
 - зчитування завдовжки щонайменше 30 п. о. з вмістом SNV понад 4 % загальної цільової довжини ампліконів (за винятком ділянок зондів);
 - зчитування довжиною менше 30 п. о. з вмістом SNV більше 10 % загальної довжини ампліконів (включно з областями зондів).
- Великі варіанти, зокрема багатонуклеотидні варіанти (multi-nucleotide variants, MNV) і великі індели, можуть звітуватися як окремі менші варіанти у вихідному файлі VCF.
- Варіанти делецій можна фільтрувати або пропускати під час охоплення двох плиткових ампліконів, якщо довжина делеції дорівнює або перевищує довжину ділянки перекриття між плитковими ампліконами.
- Система не здатна виявляти індели, коли вони виникають прямо поряд із праймером, а амплікон із перекриттям відсутній. Для областей з ампліконами, що перекриваються, аналіз не здатен виявити делеції, коли така область перекриття менша за розмір делеції, яку потрібно виявити. Наприклад, якщо область перекриття між двома суміжними ампліконами становить 2 (дві) основи, аналіз не може виявити жодні делеції, зокрема ці обидві основи. Одноосновну делецію можна виявити в будь-якій із цих основ.
- Як і в разі будь-якого робочого процесу підготовки бібліотеки на основі гібридизації, первинні поліморфізми, мутації, інсерції або делеції в ділянках зв'язування олігонуклеотидів можуть впливати на алелі, що досліджуються. А отже, вони впливають і на розпізнавання під час секвенування. Приклад наведено далі.
 - Варіант у фазі, де варіант перебуває в ділянці праймера, може не піддаватись ампліфікації, що призводить до хибнонегативних результатів.
 - Варіанти в ділянці праймера можуть заважати ампліфікації референсного алеля, що призводить до неправильного розпізнавання гомозиготного варіанта.
 - Варіанти інделів у ділянці праймера можуть призводити до хибнопозитивного розпізнавання в кінці зчитування біля праймера.
- Індели можна фільтрувати завдяки викривленню нитки, якщо вони виникають поруч із кінцем одного зчитування та піддаються м'якому усіченню під час вирівнювання.
- Малі MNV не валідовано.
- Варіанти числа копій або структурні варіанти, наприклад злиття або транслокації, не валідовано.
- Обмеження, що стосуються варіантів зародкової лінії.

- Система MiSeqDx, у якій використовується Germline Variant Module, призначена для отримання якісних результатів розпізнавання варіантів зародкової лінії (наприклад, гомозиготних, гетерозиготних, дикого типу).
- Коли використовується Germline Variant Module, мінімальне покриття на амплікон, потрібне для точного розпізнавання варіантів, становить 150x. На охоплення впливають кількість зразків і загальна кількість основ-мішеней. На охоплення може впливати вміст GC та інший геномний вміст.
- Варіація числа копій може впливати на те, яким буде визначено варіант: гомозиготним чи гетерозиготним.
- У файлах VCF варіанти в певному повторному контексті відфільтровуються. Для фільтрації варіантів використовується фільтр повторів RМxN, якщо вся послідовність варіанта або її частина повторно присутня в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. Для розпізнавання варіантів зародкової лінії в референсному геномі потрібно не менше 9 повторів, щоб варіант було відфільтровано. До уваги беруться лише повтори довжиною до 5 п. о. (R5x9).
- Обмеження, що стосуються соматичних варіантів.
 - Система MiSeqDx, у якій використовується Somatic Variant Module, призначена для отримання якісних результатів розпізнавання соматичних варіантів (тобто наявність соматичного варіанта із частотою щонайменше 0,026 із межею виявлення 0,05).
 - Коли використовується модуль Somatic Variant Module, мінімальне покриття на амплікон, потрібне для точного розпізнавання варіантів, становить 450x на пул олігонуклеотидів. На охоплення впливають кількість зразків і загальна кількість основ-мішеней. На охоплення може впливати вміст GC та інший геномний вміст.
 - У файлах VCF варіанти в певному повторному контексті відфільтровуються. Для фільтрації варіантів використовується фільтр повторів RМxN, якщо вся послідовність варіанта або її частина повторно присутня в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. Для розпізнавання соматичних варіантів у референсному геномі потрібно не менше 6 повторів, щоб варіант було відфільтровано. До уваги беруться лише повтори довжиною до 3 п. о. (R3x6).
 - Somatic Variant Module (Модуль соматичних варіантів) не здатен відрізнити варіанти зародкової лінії від соматичних варіантів. Модуль призначений для виявлення варіантів у межах діапазону частот варіантів, але частота варіанта не може використовуватися для диференціації соматичних варіантів від варіантів зародкової лінії.
 - Нормальна тканина в зразку впливає на виявлення варіантів. Зареєстрована межа виявлення базується на частоті варіанта відносно загальної ДНК, екстрагованої як із пухлини, так і з нормальної тканини.

Компоненти виробу

Illumina MiSeqDx складається з такого:

Прилад MiSeqDx (№ за каталогом DX-410-1001)

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

Прикладна програма	Функція	Опис
MiSeq Operating Software (MOS)	Контроль роботи приладу	Прикладне програмне забезпечення MOS керує роботою приладу під час секвенування й генерує зображення для використання в програмному забезпеченні Real-Time Analysis (RTA). Для отримання додаткової інформації див. <i>Довідковому посібнику до приладу MiSeqDx для MOS v4 (документ № 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Первинний аналіз	Програмне забезпечення RTA перетворює зображення, згенероване MOS для кожного сегмента на цикл прогону секвенування, на файли розпізнавання основ, які є вхідними для модулів аналізу програмного забезпечення Local Run Manager. Прикладне програмне забезпечення RTA не має інтерфейсу користувача.
Local Run Manager	Інтерфейс для вибору модуля	Програмне забезпечення Local Run Manager — це інтегроване в прилад рішення для керування користувачами, проведення вторинного аналізу й моніторингу стану. Для отримання додаткової інформації див. <i>Довідковому посібнику із програмного забезпечення Local Run Manager v4 для MiSeqDx (документ № 200046657)</i> .

Зберігання й поводження

Елемент	Специфікація
Температура	Транспортування та зберігання: від -10 °C до 40 °C Умови експлуатації: від 19 °C до 25 °C
Вологість	Транспортування та зберігання: вологість без конденсації Умови експлуатації: 30–75 % відносної вологості за відсутності конденсації

Потрібні обладнання й матеріали, які не надано

Витратні матеріали для секвенування

MiSeqDx Reagent Kit v3 (номер за каталогом 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (номер за каталогом 20063860)

Витратні матеріали, що замовляє користувач

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

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

Рекомендації стосовно хімічно чистої води

Для виконання процедур приладу завжди використовуйте хімічно чисту або деіонізовану воду. Використання водопровідної води заборонено.

Використовуйте тільки наведені нижче класи води або їхні еквіваленти.

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

Застереження



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Цей набір реагентів містить потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Вентиляція повинна бути підходящою для роботи з небезпечними матеріалами в реагентах. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосованих регіональних, державних і місцевих законів і нормативних правил. Щоб отримати додаткову інформацію про захист навколишнього середовища, здоров'я та безпеку, див. SDS (паспорт безпеки продукції) на сторінці support.illumina.com/sds.html.

- Зі зразками крові слід поводитися так, ніби вони заражені вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусом гепатиту В людини (HBV) або іншими збудниками, що передаються через кров (універсальні заходи застереження).
- Недотримання викладених процедур може призвести до неправильних результатів або значного погіршення якості зразка.
- Використовуйте стандартні заходи застереження, прийняті в лабораторії. Не використовуйте піпетування ротом. Не вживайте їжу або напої й не палить у робочих зонах. Під час роботи зі зразками та реагентами з набору надягайте одноразові рукавички й лабораторний одяг. Після роботи зі зразками та реагентами з набору ретельно мийте руки.
- Належні правила поводження й гігієна в лабораторії є обов'язковими для попередження забруднення реагентів, приладів та інструментів, а також геномних зразків ДНК продуктами полімеразної ланцюгової реакції (PCR). Забруднення продуктами PCR може призвести до неправильних і ненадійних результатів.
- Щоб попередити забруднення, виділіть для зон преампліфікації й постампліфікації спеціальне обладнання та витратні матеріали (як-от піпетки, наконечники піпеток, термостати, вихрові мішалки й центрифуги).
- У відповідних випадках, парування індексів і зразків має точно відповідати роздрукованому макету планшета. Під час уведення імені зразка в диспетчер Local Run Manager він автоматично заповнює праймери індексу, пов'язані з іменем зразка. Перед початком прогону секвенування рекомендується перевіряти зв'язок праймерів індексу зі зразками. Невідповідність між зразком і результатами макету планшета завадить виявленню позитивного зразка та призведе до отримання хибного результату.
- Наполегливо рекомендується встановити антивірусне програмне забезпечення, що замовляє користувач, для захисту комп'ютера від вірусів. Інструкції з установаження можна знайти в посібнику користувача.

- Забороняється працювати на MiSeqDx, коли з нього знято будь-яку з панелей. Експлуатація приладу, з якого знято хоча б одну з панелей, створює потенційну небезпеку від дії напруги електричної мережі й напруги постійного струму.
- Не торкайтеся платформи проточної кювети у відсіку проточної кювети. Нагрівач у цьому відсіку працює за температури від 22 °C до 95 °C, що може призвести до опіків.
- Цей прилад важить приблизно 57 кг і внаслідок падіння або неправильного поводження може призвести до тяжкого травмування.
- негайно повідомляйте про всі серйозні інциденти, пов'язані із цим виробом, у компанію Illumina й компетентну установу держави, у якій перебувають користувач і/або пацієнт.

Інструкції з використання

Наведені нижче інструкції з використання приладу MiSeqDx потребують використання реагентів, наданих у MiSeqDx Reagent Kit v3.

Створення прогону за допомогою Local Run Manager

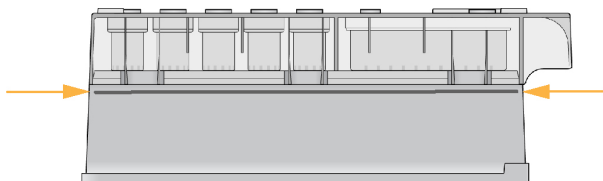
Докладні інструкції зі створення прогону див. у *Довідковому посібнику із програмного забезпечення Local Run Manager v4 для MiSeqDx (документ № 200046657)* і посібнику до модуля Local Run Manager для модуля аналізу, який ви застосовуєте.

Підготовка картриджа з реагентами

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

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

Рисунок 1 Лінія максимального рівня води



3. Нехай картридж із реагентами розморозується на водяній бані за кімнатної температури протягом 60–90 хвилин або до повного розморозування.

4. Вийміть картридж із водяної бані й обережно постукайте їм по столу, щоб прибрати воду з основи картриджа. Просушіть основу картриджа. Переконайтеся, що на верхній частині картриджа з реагентами відсутні бризки води.

Перевірка картриджа з реагентами

1. Щоб змішати розморожені реагенти, переверніть картридж із реагентами десять разів, а потім перевірте, чи розморожені всі його положення.
2. Перевірте реагенти в положеннях 1, 2 й 4, аби переконатися, що вони повністю змішалися й не містять осадів.

ПРИМІТКА Дуже важливо, щоб реагенти в картриджі були повністю розморожені й змішані для забезпечення належного секвенування.

3. Обережно постукайте картриджем по столу, щоб зменшити кількість бульбашок повітря в реагентах.

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

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

Підготовка зразків для секвенування

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

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

Завантаження бібліотек зразків до картриджа

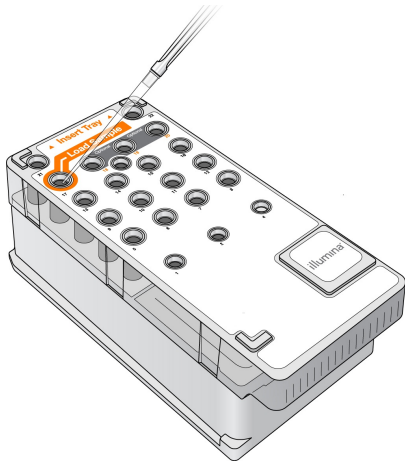
Коли картридж із реагентами повністю розморожений і готовий до використання, тоді зразки можна завантажувати до картриджа.

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

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

2. Унесіть піпеткою 600 мкл підготованих бібліотек зразків із бібліотеки розведених ампліконів (DAL) до резервуара з маркуванням **Load Samples** (Завантажити зразки). Намагайтеся не торкатися покриття з фольги.
3. Після завантаження зразка перевіряйте наявність бульбашок повітря в резервуарі. Якщо бульбашки повітря присутні, обережно постукайте картриджем по столу, щоб вивільнити бульбашки.

Рисунок 2 Завантаження бібліотек



4. Перейдіть безпосередньо до етапів налаштування прогону, використовуючи інтерфейс MiSeq Operating Software (MOS).

Налаштування прогону

Повні інструкції з налаштування прогону див. у *Довідковому посібнику до приладу MiSeqDx для MOS v4 (документ № 200010452)*.

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

Після завантаження пляшки з розчином SBS (PR2) для MiSeqDx і картриджа з реагентами програма зчитує та записує RFID. У правому нижньому куті екрана з'явиться підтвердження успішного зчитування RFID.

- Після початку прогону відкриється екран Sequencing (Секвенування). На цьому екрані ви побачите візуальне представлення виконання прогону, включно з даними про інтенсивність і показники оцінки якості (Q-показники).

Результати

Програмне забезпечення Real-Time Analysis (RTA) — це інтегроване програмне забезпечення, яке виконує аналіз зображень і розпізнавання основ, а потім присвоює оцінку якості до кожної основи для кожного циклу секвенування. Після завершення первинного аналізу модуль приладу MiSeqDx, вибраний у [Створення прогону за допомогою Local Run Manager на стор. 8](#), почне вторинний аналіз. Інформацію про інші робочі процеси див. в документації до конкретних аналізів.

Процедури контролю якості

Програмне забезпечення MiSeqDx оцінює кожний прогін, зразок і розпізнавання основ за показниками контролю якості. За потреби також слід оцінювати позитивний і негативний типи контролювання, додані до набору для підготовки бібліотеки.

Технічні характеристики

Усі дослідження проведено на приладі MiSeqDx.

У дослідженнях генів зародкової лінії для приготування бібліотек використовувався 139-варіантний аналіз на муковісцидоз MiSeqDx або реагенти TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. У двох наборах застосовуються ідентичні реагенти для приготування бібліотек, і вони мають лише одну відмінність із точки зору робочого процесу: кількість циклів полімеразної ланцюгової реакції (PCR) — 25 і 28 відповідно. Додаткові цикли PCR дають змогу досягти меншого введення ДНК для спеціального набору ампліконів TruSeq Dx (50 нг) порівняно зі 139-варіантним аналізом на муковісцидоз MiSeqDx (250 нг), що продемонстровано в дослідженні введення ДНК за допомогою TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Бібліотеки, приготовлені із застосуванням 139-варіантного аналізу на муковісцидоз MiSeqDx, було секвеновано за допомогою супровідних реагентів для секвенування в наборі. Бібліотеки, приготовлені із застосуванням TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, було секвеновано за допомогою MiSeqDx Reagent Kit v3. Останні реагенти для секвенування збільшили введення порівняно зі 139-варіантним аналізом на муковісцидоз MiSeqDx. Тестування охоплює діапазони пропускної здатності зразків, що підтримується MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Прилад MiSeqDx може підтримувати 1–96 зразків на прогін залежно від аналізу. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro призначено для підтримки нижчої пропускної здатності зразків у цьому діапазоні для вибраних аналізів.

У дослідженнях соматичних генів застосовано TruSeq Custom Amplicon Kit Dx із MiSeqDx Reagent Kit v3. Було застосовано відповідні робочі процеси для генів зародкової лінії або соматичних генів, описані для набору користувачьких ампліконів TruSeq Custom Amplicon Kit Dx для підготовки бібліотек для секвенування, з подальшим аналізом за допомогою Germline Variant Module або Somatic Variant Module відповідно за двома винятками. У дослідженнях із використанням одного гена (варіант зародкової лінії; 139-варіантний аналіз на муковісцидоз MiSeqDx) або двох генів (соматичний варіант) було застосовано залежні від аналізу робочі процеси й модулі аналізу як репрезентативні панелі мутацій.

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

Визначення обчислень, використаних у технічних характеристиках

- Показник збігу позитивних результатів (PPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як варіанти за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
 - (Кількість локусів варіантів, правильно зареєстрованих у процесі аналізу) / (загальна кількість локусів варіантів)
Локуси варіантів, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-позитивними (ТР). Локуси варіантів, зареєстровані як референсні розпізнавання або як інші розпізнавання варіантів у процесі аналізу, є хибно-негативними (ХН)
- Показник збігу негативних результатів (NPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, класифікованих як дикий тип за еталонним методом, які правильно зареєстровано в процесі аналізу.
 - (Кількість локусів дикого типу, правильно зареєстрованих у процесі аналізу) / (загальна кількість локусів дикого типу)
Локуси дикого типу, зареєстровані в процесі аналізу, що відповідають еталонному методу, є істинно-негативними (ІН). Локуси дикого типу, зареєстровані в процесі аналізу як варіанти, є хибно-позитивними (ХП).
- Відсоток загальної узгодженості (OPA) обчислюється як кількісне відношення локусів, які правильно зареєстровано в процесі аналізу відносно еталонного методу.
 - ((Кількість локусів варіантів, відображених аналізом) + (кількість локусів дикого типу, відображених аналізом)) / ((загальна кількість локусів варіантів) + (загальна кількість локусів дикого типу)).

- Що стосується програм розпізнавання варіантів, обчислення параметрів PPA, NPA та OPA не передбачає нерозпізнавання (локуси варіантів або референсного матеріалу, які не відповідають одному чи кільком фільтрам якості). Зокрема, у двох дослідженнях нерозпізнавання було включено в показник «відсоток правильних розпізнавань», і це позначено для застосовних таблиць.
- Частота розпізнавання обчислюється як загальна кількість локусів, які пройшли фільтр, поділена на загальну кількість позицій, секвенованих для хромосом 1–22. Хромосоми X та Y виключаються. Цей показник не враховує узгодженість розпізнавань з еталонним методом.

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

Індексація зразків

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

Загалом 96 індексів зразків було протестовано за допомогою репрезентативного аналізу, призначеного для пошуку низки генів, які покривають 12 588 основ на нитку в усіх 23 хромосомах людини, щоб перевірити здатність аналізу стабільно виконувати розпізнавання під час генотипування заданого зразка в різних комбінаціях праймерів індексації. Y-хромосома не містить довірчих областей і не оцінювалась. Вісім унікальних зразків було протестовано з 12 різними комбінаціями праймерів індексування на зразок. Результати зразків із модуля аналізу генів зародкової лінії було порівняно з результатами зразків Platinum Genomes версії 2016-01. PPA (SNV й індели) перевищував 97 % (істиннопозитивні розпізнавання становили щонайменше 70 для SNV, 38 для інсерцій, 36 для делецій), а NPA становив 100 % (щонайменше 23 440 референсних позицій на комбінацію індексів) для кожної з 96 комбінацій індексів. Один індекс було окремо протестовано, щоб переконатися, що хімічна реакція секвенування за допомогою набору реагентів MiSeqDx Reagent Kit v3 може підтримувати менше восьми зразків (попередня хімічна реакція за допомогою універсального набору MiSeqDx Universal Kit 1.0 обмежувалася мінімальною кількістю у вісім зразків). Один індекс мав значення PPA 98,9 % (180 зі 182) для SNV, 100 % (38 із 38) для інсерцій і 100 % (46 із 46) для делецій. NPA становив 100 % (23 856 із 23 856).

Дванадцять повторностей (24 бібліотеки) зразка було протестовано для вимірювання точності індексу із соматичними варіантами з частотою від 0,05 до 0,10 за допомогою Somatic Variant Module: для розпізнавання соматичних варіантів використовувалося по дві комбінації індексів на повторність. PPA становив 100 % для SNV (64 із 64), інсерцій (11 з 11) і делецій (19 з 19). NPA становив 100 % (принаймні 11 590 референсних позицій на комбінацію індексів) для всіх комбінацій індексів.

Перенесення зразків

Робочий процес приладу MiSeqDx включає підготовку бібліотеки й секвенування декількох зразків і контролю, які обробляються разом одночасно. Дослідження перенесення проводилося, щоб перевірити, чи впливають на результати тестування хибно-позитивні результати, отримані внаслідок перенесення

від лунки до лунки під час підготовки бібліотеки зразків, а також у разі забруднення між послідовними прогонями секвенування. Було використано соматичні варіанти, тому що їх можна виявити з нижчою частотою алелей, ніж варіанти генів зародкової лінії.

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

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

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

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

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

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

Технічні характеристики зародкової лінії

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

Точність

Описане дослідження було проведено для оцінки точності приладу MiSeqDx із MiSeqDx Reagent Kit v3 і високоякісною ДНК. У дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку низки генів, які покривають 12 588 основ для 23 різних хромосом із використанням 150 ампліконів. Y-хромосома не містить довірчих областей і не оцінювалась. 12 унікальних зразків, використаних у цьому дослідженні, було отримано від однієї родини — двох батьків і 10 дітей. У таких випадках секвенування часто виконується численними лабораторіями із застосуванням різних методів. П'ять зразків отримано від жінок і сім — від чоловіків. Кожен зі зразків було протестовано у двох повторностях. Точність було визначено для SNV, інсерцій і делецій за допомогою порівняння даних дослідження з точно охарактеризованою референсною базою даних. Послідовність референсної бази даних (Platinum Genomes, версія 2016-01) було виведено з комбінації декількох методів секвенування, загальнодоступних даних і спадкової інформації. Довірчі геномні зони було визначено на основі цього еталонного методу, якщо не зазначено інше. Загалом прогін зразків було здійснено вісім разів. Таблиці, наведені для демонстрації точності, базуються на даних із першого прогону.

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

Таблиця 1 Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	Середня частота розпізнавань	Загалом варіантів	Загалом ІП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом нерозпізнавань	Загалом ІН-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24 024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23 856	100	100	100

Зразок	Середня частота розпізнавань	Загалом варіантів	Загалом ІП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом нерозпізнавань	Загалом ІН-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

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

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

Таблиця 2 Точність на рівні ампліконів для приладу MiSeqDx

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-Г (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА(3), індел	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Індел	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Полі-А (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Полі-Т (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), індел	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ (3), індел	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А(9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Індел	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Полі-А (6)	0,26	1872	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
23	4	7780541	7780637	97	97	Полі-G (6), полі-T (5), полі-A (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Полі-A (5), індел	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Полі-A (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Полі-A (7), індел	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Полі-A (6), індел	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Полі-T (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	Індел	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	Полі-G (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Індел	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), індел	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Полі-T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Індел	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Полі-C (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Полі-G (5), індел	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Полі-A (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Індел	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Полі-A (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Індел	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Полі-G (5), індел	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Полі-G (6), полі-C (6), індел	0,71	2184	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Індел	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Полі-G (7), СТС (4), індел	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Індел	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Полі-G (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Індел	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Полі-G (5), індел	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	Полі-Т (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Індел	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), індел	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Індел	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Індел	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Полі-А (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Полі-G (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Індел	0,53	2040	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
76	11	120357801	120357885	85	85	Полі-А (5), СА (3), індел	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Полі-С (5), індел	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Полі-А (7), АС(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Полі-А (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Полі-Г (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Полі-А (5), полі-Т (7), полі-А (7), індел	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Індел	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Індел	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Полі-Т (5), індел	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Індел	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Індел	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Полі-А (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Індел	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Полі-С (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Індел	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Полі-Г (5), індел	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Полі-Т (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Індел	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Індел	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	1512	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
102	16	28997904	28997998	95	95	Полі-С (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Полі-С (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Полі-Т (5), індел	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Полі-С (5), індел	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Індел	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Індел	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Полі-Т (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Полі-А (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Полі-А (7), АТ (3), АТ(4), АТ(4), індел	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Індел	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	Полі-Т (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Полі-А (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), індел	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ (3), індел	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	2256	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
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), індел	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Індел	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Індел	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Полі-G (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Індел	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Індел	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Полі-T (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), індел	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Полі-A (6), AG (3), індел	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	Полі-T (5), полі-A (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Індел	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Індел	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Індел	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Полі-T (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Полі-C (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Полі-A (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Варіанти, для яких було зафіксовано нерозпізнавання, підсумовано в [Таблиця 3](#). Певні фільтри, які призвели до нерозпізнавань, перелічено в таблиці. Інсерцію в ампліконі 111 було відфільтровано для 9 із 16 випадків. Решта сім випадків розпізнані як референсні, а тому є ХН.

Таблиця 3 Зведення варіантів, які не розпізнано

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

¹ R5x9: фільтр повторів. Варіант відфільтровується, якщо всі варіанти або їхня частина повторно наявні в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. У референсному матеріалі має бути принаймні дев'ять повторів, до того ж розглядаються лише повтори завдовжки до 5 п. о.

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

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

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

Зразки було додатково проаналізовано для розпізнавання незначних інсерцій і делецій (інделів) ([Таблиця 5](#)). У деяких випадках індел був спільним для двох або більше зразків, що відображено в стовпчику таблиці «Загалом повторностей зразків з інделами». Результати для обох повторностей 12 придатних зразків представлено в [Таблиця 5](#). Загалом було виявлено 71 індел із розміром 1–24 п. о. для інсерцій і 1–25 п. о. для делецій. 69 інделів було виявлено з показником збігу позитивних результатів 100 %. Одну делецію (амплікон 64, делеція 2 п. о., хромосома 10 55892600 TAC>T) не вдалося правильно розпізнати, бо кожен із

варіантів делеції був нерозпізнанням через фільтр R5x9. Тому не вдалось обчислити PPA, який виключає нерозпізнання. Інший індел, інсерція 1 п. о. (хромосома 17 39589692 C>CA в ампліконі 111), також не мав правильних розпізнавань, тому що дев'ять варіантів не було розпізнано через фільтр R5x9, а сім були ХН-розпізнаннями.

Таблиця 5 Зведення даних виявлення інделів за допомогою приладу MiSeqDx

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
1	1	36450544	93	Делеція 25 п. о.	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Делеція 3 п. о.	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Інсерція 23 п. о.	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Делеція 17 п. о.	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Інсерція 5 п. о.	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Інсерція 3 п. о.	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Інсерція 7 п. о.	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Делеція 6 п. о.	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Інсерція 5 п. о.	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Інсерція 12 п. о.	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Інсерція 2 п. о.	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Делеція 23 п. о.	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Інсерція 9 п. о.	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Делеція 1 п. о.	AG>A	20	0	0	20	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнань	Загалом неправильних розпізнань інделу	Загалом правильних розпізнань інделу	PPA
25	4	56236567	66	Делеція 8 п. о.	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Інсерція 11 п. о.	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Делеція 4 п. о.	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Інсерція 8 п. о.	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Делеція 21 п. о.	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Делеція 3 п. о.	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Делеція 25 п. о.	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Делеція 23 п. о.	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Інсерція 1 п. о.	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Делеція 4 п. о.	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Інсерція 1 п. о.	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Делеція 4 п. о.	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Делеція 11 п. о.	GAATCTGCACIT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Делеція 1 п. о.	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Інсерція 4 п. о.	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Інсерція 4 п. о.	C>CAATT	2	0	0	2	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
58	9	138995370	97	Делеція 21 п. о.	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Делеція 3 п. о.	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Делеція 16 п. о.	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Делеція 2 п. о.	TAC>T	10	10	0	0	Н/Д
68	11	30177690	70	Інсерція 2 п. о.	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Інсерція 8 п. о.	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Делеція 8 п. о.	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Делеція 2 п. о.	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Інсерція 21 п. о.	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Інсерція 19 п. о.	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Інсерція 4 п. о.	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Делеція 20 п. о.	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Делеція 22 п. о.	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Інсерція 4 п. о.	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Делеція 16 п. о.	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Делеція 5 п. о.	CGTGGA>C	10	0	0	10	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнань	Загалом неправильних розпізнань інделу	Загалом правильних розпізнань інделу	PPA
95	15	63446199	68	Делеція 6 п. о.	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Делеція 25 п. о.	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Інсерція 3 п. о.	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Інсерція 4 п. о.	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Делеція 7 п. о.	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Делеція 1 п. о.	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Інсерція 18 п. о.	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Інсерція 4 п. о.	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Інсерція 1 п. о.	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Інсерція 24 п. о.	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Делеція 4 п. о.	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Делеція 12 п. о.	TTTGATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Інсерція 22 п. о.	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Інсерція 3 п. о.	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Делеція 2 п. о.	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Делеція 15 п. о.	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
131	20	25278464	101	Інсерція 5 п. о.	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Інсерція 11 п. о.	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Делеція 16 п. о.	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Інсерція 11 п. о.	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Делеція 21 п. о.	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Делеція 5 п. о.	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Інсерція 6 п. о.	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Інсерція 5 п. о.	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Делеція 10 п. о.	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Відтворюваність

Було проведено два дослідження для оцінювання відтворюваності приладу MiSeqDx із клітинними лініями (дослідження 1 і 2) і збідненою лейкоцитами кров'ю, у яку було внесено певну кількість матеріалу клітинних ліній (дослідження 2). У дослідженні 1 використовувалося кілька приладів. Дослідження 2 проводилося в кількох дослідницьких центрах.

Дослідження 1

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

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

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

Амплікон	Хромо-сома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-С (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ (3), ТАА (3), індел	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Індел	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	Полі-А (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	Полі-Т (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
13	2	200796740	200796826	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), індел	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ (3), індел	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), Полі-А (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Індел	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	Полі-А (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	Полі-Г (6), полі-Т (5), Полі-А (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	5952	0	0	5952	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
26	4	102839244	102839314	71	69	Полі-A (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	1644446743	1644446804	62	62	Полі-A (7), індел	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	Полі-A (6), індел	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	Полі-T (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), АG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Індел	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	Полі-G (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Індел	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GST(5), індел	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	Полі-T (5), ТСТ (3), СТТ (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Індел	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	Полі-C (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	Полі-G (5), індел	0,61	9024	0	0	9024	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
42	6	112435865	112435955	91	91	Полі-A (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Індел	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	Полі-A (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Індел	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	Полі-G (5), індел	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	Полі-G (6), полі-С (6), індел	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Індел	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	Полі-G (7), СТС (4), індел	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Індел	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	Полі-G (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Індел	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	Полі-G (5), індел	0,47	7488	0	0	7488	0	0

Амплі- кон	Хромо- сома	Початок амплі- кона	Кінець амплі- кона	Розмір проана- лізова- ного фраг- мента	Основи в дові- рчих обла- стях	Геном- ний вміст амплі- кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правил- ьних розпіз- навань	Загалом непра- вильних розпіз- навань	Загалом нерозпіз- навань	Загалом прави- льних розпіз- навань	Загалом неправ- ильних розпіз- навань	Загалом нерозпіз- навань
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	Полі-T (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	Полі-A (5), полі- T (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Індел	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), індел	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Індел	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Індел	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	Полі-A (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	Полі-G (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Індел	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	Полі-A (5), CA (3), індел	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	Полі-C (5), індел	0,52	8064	0	0	8064	0	0

Амплі-кон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
79	12	26811004	26811096	93	93	Полі-A (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	Полі-A (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	Полі-G (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	Полі-A (5), полі-T (7), полі-A (7), індел	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Індел	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Індел	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	Полі-T (5), індел	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Індел	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Індел	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	Полі-A (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Індел	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	Полі-C (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Індел	0,25	6528	0	0	6528	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
96	15	77879807	77879901	95	93	Полі-G (5), індел	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	Полі-T (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Індел	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Індел	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	Полі-C (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	Полі-C (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	Полі-T (5), індел	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	Полі-C (5), індел	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Індел	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Індел	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	Полі-T (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	Полі-A (13), індел (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	Полі-A (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
113	17	45438866	45438957	92	92	Полі-А (7), АТ (3), АТ (4), АТ (4), індел	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Індел	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	Полі-Т (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	Полі-А (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), індел	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ (3), індел	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG (4), індел	0,46	6720	0	0	6720	0	0

Амплі-кон	Хромо-сома	Початок амплі-кона	Кінець амплі-кона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплі-кона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
131	20	25278421	25278521	101	101	Індел	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Індел	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	Полі-G (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Індел	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Індел	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	Полі-T (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), індел	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	Полі-A (6), AG (3), індел	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	Полі-T (5), полі-A (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Індел	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Індел	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Індел	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	Полі-T (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	Полі-C (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	Полі-A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

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

Таблиця 7 Залежні від оператора результати для приладу MiSeqDx

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

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

Таблиця 8 Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	SNV				Інсерції				Делеції			
	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0

Зразок	SNV				Інсерції				Делеції			
	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Дані, отримані після восьми прогонів у цьому дослідженні відтворюваності, підтверджують гіпотезу, що прилад MiSeqDx може секвенувати з отриманням стабільних результатів наведені далі послідовності.

- Зі вмістом GC ≥ 19 % (усі основи, що розпізнавались у 192 зі 192 секвенованих ампліконів з умістом GC 19 %, розпізнано правильно із частотою нерозпізнавання 1,1 %)
- Уміст GC ≤ 78 % (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів з умістом GC 78 % розпізнано правильно без нерозпізнавань)
- Фрагменти полі-А довжиною ≤ 8 (повтор полі-А з 8 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-А в кількості 8)
- Фрагменти полі-Т довжиною ≤ 10 (повтор полі-Т з 10 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-Т в кількості 10)
- Фрагменти полі-Г довжиною ≤ 7 (повтор полі-Г із 7 нуклеотидів розпізнано правильно в 192 зі 192 секвенованих ампліконів, які містять полі-Г в кількості 7)
- Фрагменти полі-С довжиною ≤ 6 (повтор полі-С із 6 нуклеотидів розпізнано правильно для 576 з 576 секвенованих ампліконів, які містять полі-С в кількості 6)
- Довжини динуклеотидних повторів $\leq 11x$ (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів із динуклеотидним повтором 11x були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,5 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів $\leq 5x$ (усі розпізнані основи в 192 зі 192 секвенованих ампліконів із тринуклеотидним повтором 5x були розпізнано правильно з частотою нерозпізнавання 0,5 %)
- Інсерції основ у кількості не більше 24 або делеції основ у кількості не більше 25
 - 24-основні інсерції розпізнано правильно в 192 зі 192 зразків
 - 25-основні делеції розпізнано правильно в 223 зразках і неправильно в 1 зразку з 224

Дослідження 2

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

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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на Центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр	Центр	Центр	Центр	Центр	Центр					
					1	2	3	1	2	3					
A	9 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C відсутні	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр	Центр	Центр	Центр	Центр	Центр					
					1	2	3	1	2	3					
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
A	39	F508del/3849+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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр	Центр	Центр	Центр	Центр	Центр					
					1	2	3	1	2	3					
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	Н/Д	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на Центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр	Центр	Центр	Центр	Центр	Центр					
					1	2	3	1	2	3					
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
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	Н/Д	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

Панель	№ зразка	Генотип зразка	Варіанти	Загалом розпізнавань на Центр	Розпізнавання зі збігом позитивних результатів (варіанти)			Розпізнавання зі збігом негативних результатів (дикий тип)			К-ть неправильних розпізнавань	К-ть нерозпізнавань	Збіг позитивних результатів (%)	Збіг негативних результатів (%)	Загальна узгодженість (%)
					Центр	Центр	Центр	Центр	Центр	Центр					
					1	2	3	1	2	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	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/Д	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
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	Н/Д	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Загалом				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Розташування гена дикого типу, який відповідає варіанту N1303K для однієї з повторностей, призвело до нерозпізнання через недостатнє покриття.

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

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

⁴ Розташування гена дикого типу, який відповідає варіанту M1V для однієї повторності кожного з двох зразків, призвело до нерозпізнання через недостатнє покриття.

Технічні характеристики соматичної лінії

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

Точність

Для оцінювання точності приладу MiSeqDx з ДНК, екстрагованими зі зразків FFPE, було проведено три дослідження.

Дослідження 1

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

У [Таблиця 10](#) містяться дані, представлені з відсотками збігу позитивних і негативних результатів залежно від зразка, де результати варіантів порівняно з точно охарактеризованим складеним еталонним методом для обчислення PPA. Поєднано три типи варіантів (SNV, інсерції та делеції). Еталонний метод дає результати лише для одонуклеотидних варіантів та інсерцій/делецій, тому для обчислення NPA результати розпізнавання основ, які не належать до варіантів, порівнюються зі збіркою референсної послідовності генома людини hg19.

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

Зразок	Середня частота розпізнавань	Загалом варіантів	Загалом ІП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом ІН-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D ¹		675	650	0		100	100	100
GM12877-D ²	98,4	155	155	0	57 608	100	100	100

¹ Варіанти з частотою більше 20 %.

² Варіанти з частотою менше 20 %.

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

Таблиця 11 Дані точності на рівні амплікона

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
1	1	36450499	36450591	93	93	Індел	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Індел	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Індел	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Полі-С (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Полі-А (5), СТ(3), ТАА(3), індел	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Індел	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Індел	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/Д	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Полі-А (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	Полі-Т (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/Д	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), індел	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/Д	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ (3), індел	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А(9), ТГ(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Індел	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Полі-А (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Полі-С (6), полі-Т (5), полі-А (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/Д	0,29	1169	0	1	99,9

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
25	4	56236521	56236586	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Полі-А (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Полі-А (7), індел	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/Д	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/Д	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Полі-А (6), індел	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Полі-Т (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Індел	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Полі-G (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Індел	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), індел	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	Полі-Т (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Індел	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Полі-С (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Полі-G (5), індел	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Полі-А (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/Д	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Індел	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Полі-А (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Індел	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Полі-G (5), індел	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Полі-G (6), полі-С (6), індел	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/Д	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Індел	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/Д	0,42	1245	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
52	8	24811020	24811109	90	89	Полі-G (7), СТС(4), індел	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Індел	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Полі-G (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Індел	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/Д	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Полі-G (5), індел	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	Полі-Т (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Індел	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), індел	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/Д	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/Д	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/Д	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Індел	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/Д	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Індел	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/Д	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Полі-А (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/Д	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Полі-G (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Індел	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Полі-А (5), СА(3), індел	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
78	12	2834770	2834853	84	84	Полі-С (5), індел	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	Полі-А (7), АС(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/Д	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Полі-А (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Полі-Г (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Н/Д	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Полі-А (5), полі-Т (7), полі-А (7), індел	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Індел	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Індел	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/Д	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Полі-Т (5), індел	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Індел	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Індел	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Полі-А (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Індел	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Полі-С (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Індел	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Полі-Г (5), індел	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Полі-Т (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Індел	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/Д	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Індел	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/Д	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Полі-С (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Полі-С (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Полі-Т (5), індел	0,37	1362	0	3	99,8

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Полі-С (5), індел	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Індел	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Індел	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Полі-Т (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	Полі-А (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Полі-А (7), АТ(3), АТ (4), АТ(4), індел	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Індел	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	Полі-Т (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/Д	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Полі-А (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), індел	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ (3), індел	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/Д	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/Д	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/Д	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/Д	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/Д	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), індел	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Індел	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Індел	0,36	1005	0	6	99,4

Амплікон	Хромосома	Початок амплікона	Кінець амплікона	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	% правильних розпізнавань
133	20	62331904	62331994	91	88	Полі-G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Індел	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Індел	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Полі-T (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), індел	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Полі-A (6), AG(3), індел	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	Полі-T (5), полі-A (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Індел	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/Д	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Індел	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/Д	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Індел	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Полі-T (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Полі-C (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/Д	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	Н/Д
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	Н/Д
150	Y	2655609	2655679	71	0	Полі-A (5)	0,37	0	0	0	Н/Д

Варіанти, для яких було зафіксовано нерозпізнавання, підсумовано в [Таблиця 12](#). Певні фільтри, які призвели до нерозпізнавань, перелічено в таблиці.

Таблиця 12 Зведення варіантів, які не розпізнано

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

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

² R3x6: фільтр повторів. Варіант відфільтровується, якщо всі варіанти або їхня частина повторно наявні в референсному геномі, суміжному з позицією варіанта. У референсному матеріалі має бути щонайменше шість повторів, причому враховуються лише повтори довжиною не більше 3 п. о.

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

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

Зразок	К-ть ампліконів	Середня частота розпізнавань	Загалом ІП-варіантів розпізнавань	Загалом ХН-варіантів розпізнавань	Загалом ІН-розпізнавань	Загалом ХП-розпізнавань	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

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

Таблиця 14 Зведення даних виявлення інделів за допомогою приладу MiSeqDx

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
1	1	36450544	93	Делеція 25 п. о.	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
2	1	109465165	79	Делеція 3 п. о.	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Інсерція 23 п. о.	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Делеція 17 п. о.	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Інсерція 5 п. о.	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Інсерція 3 п. о.	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Інсерція 7 п. о.	T>TTTGATA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Делеція 6 п. о.	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Інсерція 5 п. о.	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Інсерція 12 п. о.	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Інсерція 2 п. о.	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Делеція 23 п. о.	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Інсерція 9 п. о.	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Делеція 1 п. о.	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Делеція 8 п. о.	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Інсерція 11 п. о.	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Делеція 4 п. о.	TAGTA>T	7	0	0	7	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
34	5	155662255	75	Інсерція 8 п. о.	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Делеція 21 п. о.	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Делеція 3 п. о.	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Делеція 25 п. о.	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Делеція 23 п. о.	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Інсерція 1 п. о.	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Делеція 4 п. о.	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Інсерція 1 п. о.	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Делеція 4 п. о.	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Делеція 11 п. о.	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Делеція 1 п. о.	AG>A	15	15	0	0	Н/Д
53	8	76518677	67	Інсерція 4 п. о.	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Інсерція 4 п. о.	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Делеція 21 п. о.	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Делеція 3 п. о.	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Делеція 16 п. о.	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнань	Загалом неправильних розпізнань інделу	Загалом правильних розпізнань інделу	PPA
64	10	55892600	89	Делеція 2 п. о.	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Інсерція 2 п. о.	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Інсерція 8 п. о.	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Делеція 8 п. о.	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Делеція 2 п. о.	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Інсерція 21 п. о.	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Інсерція 19 п. о.	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Інсерція 4 п. о.	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Делеція 20 п. о.	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Делеція 22 п. о.	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Інсерція 4 п. о.	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Делеція 16 п. о.	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Делеція 5 п. о.	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Делеція 6 п. о.	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Делеція 25 п. о.	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Інсерція 3 п. о.	C>CTTG	9	0	0	9	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
100	15	89864316	70	Інсерція 4 п. о.	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Делеція 7 п. о.	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Делеція 1 п. о.	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Інсерція 18 п. о.	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Інсерція 4 п. о.	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Інсерція 1 п. о.	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Інсерція 24 п. о.	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Делеція 4 п. о.	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Делеція 12 п. о.	TTTGATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Інсерція 22 п. о.	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Інсерція 3 п. о.	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Делеція 2 п. о.	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Делеція 15 п. о.	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Інсерція 5 п. о.	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Інсерція 11 п. о.	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Делеція 16 п. о.	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100

Амплікон	Хромосома	Позиція	Розмір проаналізованого фрагмента	Тип і довжина інделу амплікона	Індел	Загальна к-ть повторностей зразків з інделом	К-ть нерозпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань інделу	Загалом правильних розпізнавань інделу	PPA
135	21	30300873	66	Інсерція 11 п. о.	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Делеція 21 п. о.	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Делеція 5 п. о.	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Інсерція 6 п. о.	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Інсерція 5 п. о.	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Делеція 10 п. о.	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Дослідження 2

У цьому дослідженні використовувалися FFPE зразки тканини колоректального раку з банку тканин і було застосовано репрезентативний двогенний аналіз, результати якого було порівняно з показниками, отриманими за допомогою еталонного методу — двонапрямого секвенування Сенгера (метод Сенгера). Результати досліджень за методом Сенгера й репрезентативним аналізом виявилися придатними в 441 з 1183 пацієнтів загалом. Під час оцінювання на рівні пацієнтів (Таблиця 15) результати 230 з 441 пацієнта були позитивними за Сенгером (виявлено мутації за методом Сенгера). 227 із них були позитивними за репрезентативним аналізом. У решти 211 з 441 пацієнта результати були негативними за Сенгером (не виявлено мутацій за методом Сенгера). 206 із них були негативними за репрезентативним аналізом. Обчислений показник збігу позитивних результатів у відсотках (PPA) становив 98,7 %, а показник збігу негативних результатів (NPA) — 97,6 % (Таблиця 15).

Таблиця 15 Відсоток збігу позитивних і негативних результатів на рівні пацієнтів

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

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

¹ Спостерігалось 224 точних збіги для результатів у межах одного пацієнта на рівні всіх мутацій. У двох пацієнтів за допомогою MiSeqDx було виявлено одну мутацію, виявлену за методом Сенгера, і ще одну мутацію додатково. В одного пацієнта прилад MiSeqDx і метод Сенгера виявили різні мутації.

² В одного пацієнта за методом Сенгера було виявлено дві мутації. У двох пацієнтів за методом Сенгера було виявлено одну мутацію.

Дослідження 3

У цьому дослідженні оцінюються бібліотеки ДНК, приготовлені зі зразків FFPE з різних типів тканин. Загалом використано 109 зразків FFPE з восьми різних тканин (товста кишка, яєчник, підшлункова залоза, надниркова залоза, сечовий міхур, печінка, щитоподібна залоза та молочна залоза), причому кожний тип тканини представлено не менше ніж 11 зразками FFPE. Тканина надниркових залоз включала метастази з пухлин стравоходу, легенів, товстої кишки. Інші зразки тканин було взято з первинних пухлин. У цьому дослідженні застосовано репрезентативний аналіз для пошуку 26 генів, які покривають 21 577 основ для 17 різних хромосом. Загалом шість різних генів (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* і *BRAF*) було секвеновано за методом Сенгера, до того ж для кожної пухлини 1–3 гени було секвеновано за методом Сенгера на підставі прогнозованого переважання соматичних мутацій у відповідній пухлині. Унаслідок секвенування Сенгера було ідентифіковано 39 соматичних мутацій SNV в 33 зі 109 зразків FFPE. Прилад MiSeqDx ідентифікував 36 соматичних мутацій SNV в 32 зі 109 зразків FFPE з одним хибнонегативним результатом і двома нерозпізнаннями позицій варіантів. PPA становив 97,3 %. Прилад MiSeqDx

ідентифікував 78 975 референсних основ для 109 зразків FFPE з 29 хибно-позитивними результатами відносно секвенування Сенгера й 3416 нерозпізнаннями. NPA становив 99,9 %. Делеція двох основ виявилась узгодженою між двома методами. У [Таблиця 16](#) підсумовано результати за типом тканини.

Таблиця 16 Відсоток збігу позитивних і негативних результатів за типом тканини

Тип тканини	Кількість зразків	Загалом варіантів	Загалом ІП-варіантів	Загалом ХН-варіантів	Загалом ІН-розпізнавань	Загалом ХП-розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	PPA	NPA
Надниркова залоза	16	6	4	1	11 823	2	607	80	> 99,9
Сечовий міхур	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Молочна залоза	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Товста кишка	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Печінка	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Яечник	13	7	7	0	10 581	1	724	100	> 99,99
Підшлункова залоза	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Щитоподібна залоза	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Загалом	109	39	36	1	78 975	29	3416	97,3	> 99,9

Відтворюваність

Для оцінювання відтворюваності приладу MiSeqDx з ДНК, екстрагованими зі зразків FFPE, було проведено два дослідження. У дослідженні 1 використовувалося кілька приладів. Дослідження 2 проводилося в кількох дослідницьких центрах.

Дослідження 1

Відтворюваність приладу MiSeqDx було визначено з використанням двох приладів двома підготовленими операторами в загальній кількості восьми прогонів. Репрезентативний аналіз, геномний контекст ампліконів, зразки й еталонний метод були аналогічними описаним у дослідженні точності 1 вище. Результати представлено за ампліконами для кожного приладу ([Таблиця 17](#)), щоб продемонструвати відтворюваність розпізнавання для приладів. % правильних розпізнавань включав як неправильні розпізнавання, так і нерозпізнавання (коли в разі розпізнавання варіантів критерії одного чи декількох фільтрів не задовольняються). Прилади згенерували подібну кількість нерозпізнавань для кожного конкретного амплікона. Одне

неправильне розпізнавання в довірчій області, визначеній за референсним стандартом Platinum Genomes, спостерігалось для MiSeqDx 1. Неправильне розпізнавання було хибно-позитивним розпізнаванням варіанта інсерції в ампліконі 64 шуканої послідовності генів у хромосомі 10 у позиціях від 55892599 до 55892687. Амплікон містив динуклеотидний повтор 11.

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

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
1	1	93	93	Індел	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	Полі-А (5), полі-С (5), індел	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Індел	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Індел	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	Полі-С (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	Полі-Т (10), індел	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	Полі-А (5), СТ(3), ТАА (3), індел	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Індел	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Індел	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Н/Д	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	Полі-А (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	Полі-Т (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	Полі-Т (5), індел	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	Полі-Т (5), полі-А (6), індел	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Н/Д	0,43	5579	0	1	5579	0	1

Амплікони	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
16	2	73	73	Полі-Т (5), індел	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	АТ(3), індел	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Н/Д	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	СТ (3), індел	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	Полі-А (5), полі-Т (5), полі-А(9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Індел	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	Полі-А (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	Полі-С (6), полі-Т (5), полі-А (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Н/Д	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	Полі-А (5), індел	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	Полі-А (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	Полі-А (7), індел	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Н/Д	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	СТ(3), ССА (3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Н/Д	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	Полі-А (6), індел	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	Полі-Т (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
33	5	91	91	СТ(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Індел	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	Полі-G (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Індел	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), індел	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Полі-Т (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Індел	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	Полі-С (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	Полі-G (5), індел	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	Полі-А (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Н/Д	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Індел	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	Полі-А (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Індел	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	Полі-G (5), індел	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	Полі-G (6), полі-С (6), індел	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Н/Д	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Індел	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Н/Д	0,42	4980	0	0	4980	0	0

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
52	8	90	89	Полі-G (7), СТС(4), індел	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Індел	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	Полі-G (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Індел	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Н/Д	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	АТ(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	Полі-С (6), індел	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	Полі-G (5), індел	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	Полі-Т (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	Полі-А (5), полі-Т (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Індел	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	АС(11), індел	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Н/Д	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Н/Д	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Н/Д	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Індел	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Н/Д	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Індел	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Н/Д	0,59	6120	0	0	6118	0	2

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
72	11	73	73	Полі-A (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Н/Д	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	Полі-G (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Індел	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Полі-A (5), СА(3), індел	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	Полі-C (5), індел	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	Полі-A (7), АС(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Н/Д	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	Полі-A (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	Полі-G (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Н/Д	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	Полі-A (5), полі-T (7), полі-A (7), індел	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Індел	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Індел	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), ТА (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Н/Д	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	Полі-T (5), індел	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Індел	0,38	4860	0	2	4860	0	0

Амплікон	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
91	14	91	91	Індел	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	Полі-А (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Індел	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	Полі-С (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Індел	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	Полі-G (5), індел	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	Полі-Т (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Індел	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Н/Д	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Індел	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Н/Д	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	Полі-С (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	ТА(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	Полі-С (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	Полі-Т (5), індел	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	Полі-С (5), індел	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Індел	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Індел	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	Полі-Т (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Полі-А (13), індел (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	Полі-А (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1

Амплікони	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
113	17	92	92	Полі-А (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), індел	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Індел	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	Полі-Т (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Н/Д	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	Полі-А (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	Полі-А (5), індел	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	СТС(3), індел	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	СТ (3), індел	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Н/Д	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Н/Д	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Н/Д	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Н/Д	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Н/Д	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	АС(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	СТ(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), індел	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Індел	0,63	6060	0	0	6060	0	0

Амплікони	Хромосома	Розмір проаналізованого фрагмента	Основи в довірчих областях	Геномний вміст амплікона	Вміст GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань	Загалом правильних розпізнавань	Загалом неправильних розпізнавань	Загалом нерозпізнавань
132	20	67	67	Індел	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	Полі-G (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Індел	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Індел	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	Полі-T (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), індел	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	Полі-A (6), AG(3), індел	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	Полі-T (5), полі-A (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Індел	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Н/Д	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Індел	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Н/Д	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Індел	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	Полі-T (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	Полі-C (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Н/Д	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Н/Д	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Н/Д	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	Полі-A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Результати дослідження відтворюваності було проаналізовано залежно від оператора з використанням частоти варіантів (Таблиця 18). Цей аналіз продемонстрував, що частоти варіантів збігались у всіх операторів. Представлені середні частоти варіантів ± 1 стандартне відхилення.

Таблиця 18 Залежні від оператора результати для приладу MiSeqDx

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

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

Таблиця 19 Узгодженість результатів розпізнавання основ приладом MiSeqDx за зразками

Зразок	SNV				Інсерції				Делеції			
	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН	Загалом	Загалом ІП	Загалом ХП	Загалом ХН
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 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 Варіанти із частотою понад 20 %.

² Варіанти із частотою менше за 20 %.

Дані, отримані після 8 прогонів у цьому дослідженні відтворюваності, підтверджують гіпотезу, що прилад MiSeqDx може секвенувати з отриманням стабільних результатів наведені далі послідовності.

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

- Фрагменти полі-С довжиною ≤ 6 (повтор полі-С із 6 нуклеотидів розпізнано правильно для 359 з 360 секвенованих ампліконів, які містять полі-С в кількості 6, з 1 нерозпізнанням)
- Довжини динуклеотидних повторів $\leq 4x$ (усі розпізнані основи в 600 із 600 секвенованих ампліконів із динуклеотидним повтором 4x було розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 0,4 %)
- Довжини тринуклеотидних повторів $\leq 5x$ (усі розпізнані основи в 120 зі 120 секвенованих ампліконів із тринуклеотидним повтором 5x було розпізнано правильно з частотою нерозпізнання 1,9 %)
- Інсерції основ у кількості не більше 24 або делеції основ у кількості не більше 25
 - 24-основні інсерції розпізнано правильно в 120 зі 120 зразків
 - 25-основні делеції розпізнано правильно в 182 зразках і зареєстровано як нерозпізнання у 2 зразках зі 184

Дослідження 2

Для оцінювання відтворюваності репрезентативного двогеного аналізу, описаного в дослідженні точності 2, було проведено зовнішнє дослідження. Воно проводилося в трьох зовнішніх дослідницьких центрах (по два оператори в кожному центрі) з використанням однієї серії реагентів протягом трьох неспідовних днів. Випробування проводилося з використанням шести точно охарактеризованих панелей зразків геномної ДНК, екстрагованої зі зразків FFPE, отриманих від пацієнтів, або клітинних ліній. Кожна панель складалася з 10 елементів із загальною кількістю 60 елементів у всіх панелях.

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

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

У разі поєднання даних від різних центрів показник проходження контролю якості зразками становив $\geq 94,7$ % для першого прогону зразка або для зразків, досліджених у прогонах, які були придатні під час першого проходження. ВПР для рівня мутацій у всіх мутантних зразках становив 99,6 % (905/909) (95%-й ДІ: 98,9; 99,8). Кількість спроб розпізнавань щодо всіх 56 панельних мутацій (незалежно від того, чи була виявлена мутація прогнозованою) для всіх придатних зразків становила 58 856 (56 \times 1051).

Із цих 58 856 виявлених мутацій лише в шести випадках виявлені й прогнозовані результати були розбіжними. ВПР для рівня мутацій поміж усіх позитивних і негативних варіантів з усіх мутантних і диких елементів панелі разом становив 99,99 % (58 850 із 58 856).

Аналітична чутливість (межа холостої проби (LoB) і межа виявлення (LoD))

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

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

Таблиця 20 Межа холостої проби

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

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

Таблиця 21 Межа виявлення

Серія реагентів	Тип варіанта	Загальна кількість частот варіантів	К-ть вимірювань частоти варіантів < 2,6 %	% вимірювань частоти варіантів < 2,6 %	Межа виявлення (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Інсерція	360	0	0,00	4,86
	Делеція	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Інсерція	360	0	0,00	4,88
	Делеція	360	0	0,00	5,24

Наведені нижче дослідження продемонстрували експлуатаційні характеристики приладу MiSeqDx під час проведення іншого репрезентативного аналізу 56 мутацій для двох клінічно значущих генів раку (панель мутацій). Панель мутацій призначено саме для виявлення 56 мутацій у двох клінічно значущих генах раку (ген 1 і ген 2). Під час аналізу одночасно визначається присутність або відсутність кожної з 56 мутацій у кожному секвенованому зразку. Еталонним методом для цих досліджень було двонапрявне секвенування Сенгера.

Міжсерійна прецизійність

Дослідження міжсерійної прецизійності було проведене для оцінювання роботи приладу MiSeqDx із низкою серій готових наборів реагентів (які складаються з реагентів для кваліфікації зразка, підготовки бібліотеки й секвенування) за допомогою двогеного репрезентативного аналізу з використанням панелі з п'яти сумішей зразків FFPE, які відповідають вимогам до кваліфікації зразка. Кожний зразок FFPE містив дві унікальні мутації: одну з низькою частотою мутації (приблизно 8 %), а іншу — з високою (приблизно 14 %). Протягом трьох неспідовних днів було проведено 12 (дванадцять) спостережень для кожної з п'яти сумішей зразків із використанням трьох серій набору реагентів. Загальна кількість спостережень для дослідження всіх серій реагентів становила 180 спостережень для всіх сумішей зразків і 360 спостережень для всіх рівнів частоти мутацій. У всіх серіях

і в усі дні прогнозований результат щодо мутацій було виявлено в 99,7 % (359/360) випадків спостережень. Одну мутацію з низькою частотою було неправильно розпізнано як дикий тип. Для кожної з мутацій / кожного з рівнів частоти мутацій було проведено аналіз компонентів дисперсії з метою оцінки варіабельності системи. Загальне стандартне відхилення варіювалося від 0,011 до 0,029. Значення компонента «серія реагентів» для загального стандартного відхилення варіювалося від 0 до 0,015.

Історія редакцій

Номер документа	Дата	Опис зміни
Номер документа 200006218, версія 02	Жовтень 2023 р.	Оновлено посилання на Local Run Manager для версії 4. Оновлено маркування з метою додавання детальної інформації про австралійського спонсора. Виправлено розбіжності, коли інструкція з використання відрізняється від звіту про дослідження перевірки приладу MiSeqDx.
Номер документа 200006218, версія 01	Травень 2022 р.	До «Надані обладнання й матеріали, не потрібні» додано інструкцію з використання MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro CN. До технічних характеристик додано інформацію про тестування для MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Видалено застереження, що стосується США, з розділу «Застереження».
Номер документа 200006218, версія 00	Листопад 2021 р.	Початкова редакція для підтримки програмного забезпечення MOS версії 4.0 та Local Run Manager версії 3.0.

Патенти й товарні знаки

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

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

НЕПОВНЕ ВИВЧЕННЯ ВСІХ ЗАЗНАЧЕНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ ВКАЗІВОК І ЇХНЕ НЕЧІТКЕ ДОТРИМАННЯ МОЖЕ ПРИЗВОДИТИ ДО ПОШКОДЖЕННЯ ЦИХ ВИРОБІВ, ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ, ЗОКРЕМА КОРИСТУВАЧІВ АБО ІНШИХ ОСІБ, І ПОШКОДЖЕННЯ ІНШОЇ ВЛАСНОСТІ, А ТАКОЖ ПРИЗВЕДЕ ДО ВТРАТИ БУДЬ-ЯКИХ ГАРАНТІЙНИХ ЗОБОВ'ЯЗАНЬ, ЗАСТОСОВНИХ ДО ЦИХ ВИРОБІВ.

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

© 2023 р. Illumina, Inc. Усі права застережено.

Усі товарні знаки — власність компанії Illumina, Inc. або їхніх відповідних власників. Конкретну інформацію про товарні знаки зазначено на сторінці www.illumina.com/company/legal.html.

Контактна інформація



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



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

Австралійський спонсор

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

Маркування виробу

Повний список символів, які може бути зображено на упаковці або маркуванні виробу, див. у поясненні символів на вебсайті support.illumina.com на вкладці *Documentation* (Документи) для вашого набору.