

## Iepakojuma ieliktnis instrumentiem ar MOS v4

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM. TIKAI EKSPORTAM.

## Paredzētais lietojums

MiSeqDx iekārta ir paredzēta DNS bibliotēku mērķētai sekvencēšanai, izmantojot cilvēka genoma DNS, kas iegūta no perifērajām pilnasinīm vai formalīnā fiksētiem parafīnā iegultiem (FFPE) audiem, ja to lieto *in vitro* diagnostikas (IVD) testiem, ko veic ar iekārtu. MiSeqDx iekārta nav paredzēta visa genoma vai *de novo* sekvencēšanai. MiSeqDx iekārta ir jāizmanto kopā ar reģistrētiem un uzskaitītiem, akceptētiem vai apstiprinātiem IVD reaģentiem un analītisko programmatūru.

## Procedūras principi

Illumina MiSeqDx ir paredzēta cilvēka DNS mērķētai atkārtotai sekvencēšanai, izmantojot Illumina sekvencēšanas palīgmateriālus un bibliotēkas, kuras sagatavotas no cilvēka genoma DNS, kas iegūta no perifērajām pilnasinīm vai FFPE audiem, izmantojot reģistrētus un uzskaitītus, akceptētus vai apstiprinātus IVD reaģentus. Bibliotēkas tiek sagatavotas, amplificējot mērķus un pievienojot paraugu indeksus un uztvertās sekvenču. Paraugu bibliotēkas tiek uztvertas plūsmas elementā un sekvencētas instrumentā, izmantojot sekvencēšanu ar sintēzes (SBS) ķīmiju. SBS ķīmijā tiek izmantota atgriezeniska terminatora metode, lai noteiktu atsevišķas nukleotīdu bāzes, jo tās ir iekļautas augošās DNS virknēs. Real-Time Analysis (RTA) programmatūra veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze ir pabeigta, sekundārā analīze MiSeqDx iekārtā veic bāzu noteikšanu.

Apstrādē parasti ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, savietošana, variantu noteikšana un variantu noteikšanas formāta (VCF) failu ģenerēšana ar informāciju par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem. Atkarībā no darbplūsmas MiSeqDx izmanto dažādas sekundārās analīzes moduļus.

## Duālās sāknēšanas konfigurācija

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

# Procedūras ierobežojumi

- Tikai *in vitro* diagnostikas nolūkiem.
- Marķējumā norādītie rezultāti tika iegūti ar reprezentatīvo analīžu paneļiem, izmantojot pilna sastāva perifērās asinis vai šūnu līnijas dzimumšūnu veikspējas noteikšanai vai FFPE audus vai FFPE šūnu līnijas somatiskās veikspējas noteikšanai, kā arī aprakstītos reaģentus un programmatūras moduļus. Germline Variant un Somatic Variant moduļi tika izstrādāti, lai novērtētu veikspēju ar reprezentatīvajiem testiem. Veikspējas raksturlielumi tiek sniegti tikai informatīvos nolūkos. Norādītā validācijas testēšana kalpo tikai instrumenta vispārējo iespēju demonstrēšanai un nenosaka instrumenta iespējas vai piemērotību attiecībā uz jebkādiem īpašiem apgalvojumiem. Visiem diagnostikas testiem, kas izstrādāti lietošanai šajā instrumentā, nepieciešama pilnīga visu veikspējas aspektu validācija.
- Šī izstrādājuma veikspējas raksturlielumu ierobežojumi ir norādīti tālāk:
  - Sekvencēšanas izvade  $\geq 5$  Gb, ja lasījuma garums ir  $2 \times 150$  bp
  - Lasījumu caurlaides filtrs  $\geq 15$  miljoni, ja lasījuma garums ir  $2 \times 150$  bp
  - Bāzes, kas augstākas par Q30  $\geq 80$  %, lasījuma garumā  $2 \times 150$  bp  
Vismaz 80 % no bāzēm Phred skalas kvalitātes novērtējums ir lielāks par 30, norādot, ka bāzu noteikšanas precizitāte ir lielāka par 99,9 %.
- MiSeqDx iekārta ir validēta tikai tādu cilvēka DNS bibliotēku sekvencēšanai, kas ekstrahētas no perifērajām pilnasinīm vai FFPE audiem. Bibliotēkas, kas ģenerētas no cita tipa paraugiem, šajā instrumentā nevar izmantot *in vitro* diagnostikas nolūkiem. Šī instrumenta veikspēja mikrobu vai vīrusu nukleīnskābju sekvencēšanā no klīniskajiem paraugiem nav noteikta.
- MiSeqDx iekārta ir paredzēta *in vitro* diagnostikas lietošanai kopā ar reģistrētiem un uzskaitītiem, akceptētiem vai apstiprinātiem IVD reaģentiem vai testiem. Šajā lietošanas pamācībā aprakstītie reaģentu ierobežojumi un veikspējas raksturlielumi ir balstīti uz reprezentatīvajiem testiem un programmatūras moduļiem. Par IVD testu paredzēto lietojumu, noteiktajiem variantiem un paraugu tipu skatiet attiecīgā testa lietošanas pamācību.
- Analīžu programmatūra nesaskaņo indeli (ievietojumi, dzēsumi un to kombinācijas) saturu, kura garums pārsniedz 25 bp. Līdz ar to indeli, kuru garums ir lielāks par 25 bp, ar šo analīzes programmatūru nav konstatējami.
- Sistēma ir apstiprināta atsevišķu nukleotīdu variantu (SNV) konstatēšanai un līdz 25 bp dzēsumu un 24 bp ievietojumu konstatēšanai, ja to izmanto kopā ar moduļu Germline Variant Module un Somatic Variant Module programmatūru. Somaticās noteikšanas laikā ar variantu biežumu 0,05 tika konstatēti 25 bp dzēsumi un 18 bp ievietojumi.
- Amplikonu lasījumus ar galēju variantu saturu analīzes programmatūra var nesalāgot, tādējādi reģions var tikt ziņots kā savvaļas tips. Šādā galējā saturā ietilpst:
  - lasījumi, kas satur vairāk nekā trīs indelus.
  - lasījumi, kuru garums ir vismaz 30 bp, ar SNV saturu, kas lielāks par 4 % no kopējā amplikona mērķa garuma (izņemot zondes reģionus).

- lasījumi, kuru garums ir mazāks par 30 bp un kuros SNV saturs ir lielāks par 10 % no kopējā amplikona garuma (ieskaitot zondes reģionus).
- Lielu variantu, ieskaitot multinukleotīdu variantus (MNV) un lielus indelus, izvades VCF failā var tikt ziņoti kā atsevišķi mazāki varianti.
- Gadījumos, kad ir aptverti divi pārklājušies amplikoni, dzēsumu varianti var tikt izfiltrēti vai izlaisti, ja dzēsuma garums ir lielāks par vai vienāds ar pārklājumu starp pārklātajiem amplikoniem.
- Sistēma nevar konstatēt indelus, ja tie notiek tieši blakus praimerim un ja nav pārklājoša amplikona. Reģioniem, kuros amplikoni pārklājas, analīze nevar konstatēt delēcijas, ja pārklāšanās reģions ir mazāks par konstatējamās delēcijas lielumu. Piemēram, ja pārklāšanās reģions starp diviem blakus esošiem amplikoniem ir divas (2) bāzes, analīze nevar konstatēt dzēsumus, kas ietver šīs abas bāzes. Ir iespējams konstatēt vienu bāzes delēciju jebkurai no šīm bāzēm.
- Tāpat kā jebkurai uz hibridizāciju balstīta bibliotēkas sagatavošanas darbplūsmā, pamatā esošie polimorfismi, insercijas vai dzēsumi oligonukleotīdu saistīšanās reģionos var ietekmēt alēļu zondēšanu. Līdz ar to tiek ietekmēti arī sekvenčēšanas laikā veiktie noteikšanas mēģinājumi. Turpmāk sniegti piemēri:
  - Variants fāzē ar variantu praimera reģionā var netikt amplificēts, tādējādi tiek iegūts kļūdaini negatīvs rezultāts.
  - Varianti praimera reģionā var traucēt atsauces alēles amplifikāciju, tādējādi izraisot nepareizu homoizgotiska varianta noteikšanu.
  - Delēciju varianti praimera reģionā var izraisīt nepatiesi pozitīvu noteikšanu nolasījuma beigās blakus praimerim.
- Indeli var tikt filtrēti virkņu novirzes dēļ, ja tie rodas tuvu viena lasījuma beigām un ja tiem veikta daļēja salāgošana, nedzēšot nesalāgoto daļu.
- Nelieli MNV nav validēti.
- Kopiju skaita varianti vai strukturālie varianti, piemēram, saplūšana vai translokācija, nav validēti.
- Dzimumšūnas līnijas ierobežojumi:
  - MiSeqDx sistēma, izmantojot Germline Variant moduli, ir paredzēta, lai nodrošinātu kvalitatīvus rezultātus dzimumšūnas līniju variantu noteikšanai (piemēram, homoizgotisku, heterozigotiskus, savvaļas tipa).
  - Lietojot kopā ar moduli Germline Variant Module, minimālais segums uz amplikonu, kas ir nepieciešams akurātai variantu noteikšanai, ir 150x. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
  - Kopiju skaita variācijas var ietekmēt to, vai variants tiek identificēts kā homoizgotisks vai heterozigotisks.
  - Varianti noteiktā atkārtotā kontekstā tiek izfiltrēti no VCF failiem. Tiek izmantots RMxN atkārtojumu filtrs, lai filtrētu variantus, ja visa varianta vai tā daļas sekvenca atkārtoti parādās atsauces genomā blakus varianta pozīcijai. Dzimumšūnas līnijas variantu noteikšanā atsaucē ir nepieciešami vismaz 9 atkārtojumi, lai variants tiktu izfiltrēts, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 5 bp (R5x9).

- Somatiskie ierobežojumi:
  - MiSeqDx sistēma, izmantojot Somatic Variant moduli, ir paredzēta, lai nodrošinātu kvalitatīvus rezultātus somatisko variantu noteikšanai (piemēram, somatisko variantu klātbūtne, kur varianta biežums ir vienāds vai lielāks par 0,026, ja noteikšanas robežvērtība ir 0,05).
  - Lietojot kopā ar moduli Somatic Variant Module, minimālais segums uz amplikonu, kas ir nepieciešams akurātai variantu noteikšanai, ir 450x uz oligonukleotīdu fondu. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
  - Varianti noteiktā atkārtotā kontekstā tiek izfiltrēti no VCF failiem. Tiek izmantots RMxN atkārtojumu filtrs, lai filtrētu variantus, ja visa varianta vai tā daļas sekvenca atkārtoti atrodas atsaucēs genomā blakus varianta pozīcijai. Somatisko variantu noteikšanas gadījumā atsaucē ir jābūt vismaz 6 atkārtojumiem, lai variants tiktu izfiltrēts, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 3 bp (R3x6).
  - Modulis Somatic Variant Module nevar noteikt atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem. Modulis ir paredzēts, lai konstatētu variantus dažāda variantu biežuma diapazonā, bet variantu biežumu nevar izmantot, lai noteiktu atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem.
  - Normāli audi paraugā ietekmē variantu konstatēšanu. Ziņotā noteikšanas robeža balstās uz variantu biežumu attiecībā pret kopējo DNS, kas ekstrahēta gan no audzēja, gan no normāliem audiem.

## Izstrādājuma komponenti

illumina MiSeqDx sastāv no tālāk norādītajiem komponentiem:

MiSeqDx iekārta (Kataloga Nr. DX-410-1001)

MiSeqDx iekārtas darbībai un datu analīzei nepieciešami tālāk uzskaitītie programmatūras komponenti:

Programmatūras lietojumprogramma	Funkcija	Apraksts
MiSeq operētājsistēma (MOS)	Kontrolē instrumenta darbību	MOS programmatūras lietojumprogramma pārvalda iekārtas darbību sekvencēšanas laikā un ģenerē attēlus, ko izmantot Real-Time Analysis (RTA) programmatūrai. Papildinformācija pieejama sadaļā <i>MiSeqDx instrumenta atsaucēs rokasgrāmata programmatūrai MOS v4 (dokumenta Nr. 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Veic primāro analīzi	RTA programmatūras lietojumprogramma konvertē MOS ģenerētos attēlus katram elementam sekvencēšanas izpildes ciklā par bāzu noteikšanas failiem, kuri ir ievaddati Local Run Manager analīzes moduļiem. RTA programmatūras lietojumprogrammai nav lietotāja saskarnes.

Programmatūras lietojumprogramma	Funkcija	Apraksts
Local Run Manager	Saskarne moduļa atlasīšanai	Local Run Manager programmatūra ir iekārtā iebūvēts lietotāju pārvaldības risinājums sekundārās analīzes izpildīšanai un statusa pārraudzīšanai. Papildinformāciju skatiet sadaļā <i>Local Run Manager v4 Programmatūras atsaucēs rokasgrāmata iekārtai MiSeqDx (dokumenta Nr. 200046657)</i> .

## Uzglabāšana un izmantošana

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

## Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, netiek nodrošināti

### Sekvencēšanas palīgmateriāli

MiSeqDx reaģentu komplekts v3 (Kataloga Nr. 20037124)

MiSeqDx reaģentu komplekts v3 Micro (Kataloga Nr. 20063860)

### Lietotāja nodrošināmie palīgmateriāli

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

Palīgmateriāls	Nolūks
Spirta salvetes, 70 % izopropanols vai etanols, 70 %	Plūsmas šūnas stikla un platformas tīrīšana
Laboratorijas mazplūksnu salvetes	Plūsmas šūnas platformas tīrīšana
Lēcu tīrīšanai paredzēts papīrs, 4 x 6 collas	Plūsmas elementa tīrīšana
Tween 20	Instrumenta mazgāšana

Paļīgmateriāls	Nolūks
Pincete, plastmasas, ar kvadrāta formas galu (neobligāti)	Plūsmas šūnas izņemšana no plūsmas šūnas pārvadāšanas konteinera
Ūdens, laboratorijas kvalitāte	Instrumenta mazgāšana

## Vadlīnijas par laboratorijas klases ūdeni

Vienmēr izmantojiet laboratorijas klases ūdeni vai dejonizētu ūdeni, lai veiktu procedūras ar instrumentu. Nekad neizmantojiet krāna ūdeni.

Izmantojiet tikai tālāk norādīto vai līdzvērtīgas klases ūdeni:

- Dejonizēts ūdens
- Illumina PW1
- 18 megaomu (MΩ) ūdens
- Milli-Q ūdens
- Super-Q ūdens
- molekulārās bioloģijas pakāpes ūdens

## Brīdinājumi un piesardzības pasākumi



### BRĪDINĀJUMS

**Šajā reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Ventilācijai jābūt piemērotai darbam ar bīstamiem materiāliem reaģentos. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem.** Papildinformācija par vidi, veselību un drošumu pieejama drošības datu lapā vietnē [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- Rīkojieties ar visiem asins paraugiem tā, it kā būtu zināms, ka tie inficēti ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), cilvēka B hepatīta vīrusu (HBV) un citiem ar asinīm pārnēsājamu patogēnu ierosinātājiem (vispārīgi piesardzības pasākumi).
- Neievērojot aprakstītās procedūras, rezultāti var būt kļūdaini vai var ievērojami pasliktināties parauga kvalitāte.
- Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojieties ar paraugiem un komplekta reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimdus un laboratorijas uzsvārcus. Pēc paraugu un komplekta reaģentu izmantošanas ir rūpīgi jānomazgā rokas.

- Ir nepieciešama pienācīga laboratorijas prakse un laba laboratorijas higiēna, lai PĶR produkti nepiesārņotu reaģentus, instrumentus un genoma DNS paraugus. PĶR piesārņojums var izraisīt kļūdainus un neuzticamus rezultātus.
- Lai nepieļautu piesārņojumu, pārliecinieties, ka pirmsamplifikācijas un pēcampifikācijas zonās ir nepieciešamais aprīkojums un palīgmateriāli (piemēram, pipetes, pipešu uzgaļi, sildīšanas bloki, maisītāji un centrifūgas).
- Ja nepieciešams, rādītāju-paraugu savienošanai precīzi jāatbilst drukātajam plates izkārtojumam. Local Run Manager automātiski aizpilda rādītāju praimerus, kas saistīti ar paraugu nosaukumiem, kad tie ievadīti modulī. Pirms sekvencēšanas izpildes lietotājam ir ieteicams pārbaudīt indeksu praimeru saistību ar paraugiem. Nesakrītības starp paraugu un plates izkārtojumu rezultējas pozitīvas parauga identifikācijas zudumā un nepareizā rezultātu ziņošanā.
- Lai aizsargātu datoru pret vīrusiem, ir ļoti ieteicams instalēt lietotāja piegādātu pretvīrusu programmatūru. Instalēšanas instrukcijas skatiet lietotāja rokasgrāmatā.
- Nelietojiet MiSeqDx, ja kāds no paneļiem ir noņemts. Ja instruments tiek darbināts, kamēr kāds no paneļiem ir noņemts, pastāv risks saskarties ar līnijas spriegumu un līdzstrāvas spriegumu.
- Nepieskarieties plūsmas elementa stāvoklim plūsmas elementa nodaļījumā. Sildītājs šajā nodaļījumā darbojas 22–95 °C diapazonā un var izraisīt apdegumus.
- Instruments sver aptuveni 57 kg (126 mārciņas) un var radīt nopietnus ievainojumus, ja to nepareizi lieto un ja tas nokrīt.
- Par jebkādu nopietnu negadījumu saistībā ar šo izstrādājumu nekavējoties ziņojiet Illumina un tās dalībvalsts kompetentajai iestādei, kurā atrodas lietotājs un/vai pacients.

## Lietošanas instrukcija

Šajā MiSeqDx iekārtas lietošanas pamācībā ir nepieciešami reaģenti, kas iekļauti MiSeqDx reaģentu komplekts v3.

### Izpildes izveidošana ar Local Run Manager

Detalizētus norādījumus par izpildes izveidošanu skatiet izmantotā analīzes moduļa *Local Run Manager v4 Programmatūras atsauces rokasgrāmata iekārtai MiSeqDx (dokumenta Nr. 200046657)* un Local Run Manager moduļa rokasgrāmatā.

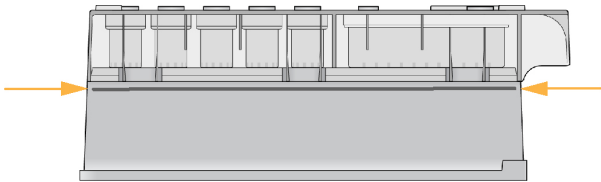
### Reaģentu kasetnes sagatavošana

Tālā sniegtos norādījumos aprakstīts, kā atkausēt reaģentus, izmantojot istabas temperatūras ūdens peldi.

1. Izņemiet reaģentu kasetni no uzglabāšanas vietas, kuras temperatūra ir no –15 °C līdz –25 °C.

2. Ievietojiet reaģentu kasetni ūdens vannā, kur ir pietiekami daudz dejonizēta ūdens istabas temperatūrā, lai reaģentu kasetnes pamatni iegremdētu līdz ūdens līnijai, kura ir drukāta uz šīs reaģentu kasetnes. Neļaujiet ūdenim pārsniegt maksimālo ūdens līniju.

Attēls 1 Maksimālā ūdens līnija



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

## Reaģentu kasetnes pārbaudīšana

1. Apgrieziet reaģentu kasetni desmit reizes, lai sajauktu atkausētos reaģentus, un pēc tam pārbaudiet, vai visas pozīcijas ir atkusušas.
2. Pārbaudiet reaģentus 1., 2. un 4. pozīcijā, lai pārlicinātos, ka tie ir pilnībā samaisīti un ka tajos nav nogulšņu.

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

3. Lai samazinātu reaģentos esošo gaisa burbuļu skaitu, viegli piesitiet ar kasetni pret galdu.

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

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

## Paraugu sagatavošana sekvencēšanai

Norādījumus par to, kā sagatavot paraugu bibliotēkas sekvencēšanai, tostarp par bibliotēku atšķaidīšanu un apkopošanu, skatiet bibliotēku sagatavošanas komplekta ieliktna sadaļu Lietošanas pamācība.

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



## Paraugu bibliotēku ievietošana kasetnē

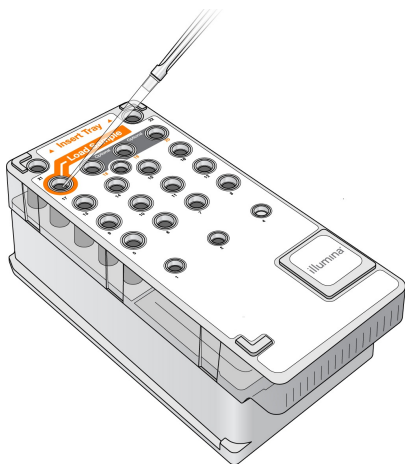
Kad reaģentu kasetne ir pilnīgi atkausēta un gatava lietošanai, jūs esat gatavs ievietot paraugus kasetnē.

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

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

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

Attēls 2 Bibliotēku ievietošana



4. Pārejiet tieši pie izpildes iestatīšanas darbībām, izmantojot MiSeq operētājsistēma (MOS) saskarni.

## Izpildes iestatīšana

Pilnas izpildes iestatīšanas norādījumus skatiet *MiSeqDx instrumenta atsauces rokasgrāmata programmatūrai MOS v4 (dokumenta Nr. 200010452)*.

1. Autorizējieties MiSeqDx, izmantojot savu Local Run Manager programmatūras paroli.
2. MOS programmatūras Home (Sākuma) ekrānā atlasiet **Sequence**(Sekvence).
3. Sarakstā atlasiet kādu izpildi un pēc tam atlasiet **Next** (Tālāk).  
Tiek parādīta izpildes iestatīšanas ekrānu sērija šādā secībā: ievietojiet plūsmas elementu, ievietojiet reaģentus, pārskatiet un veiciet pirmsizpildes pārbaudi.
4. Kad tiek parādīts ekrāns "Ievietot plūsmas elementu", notīriet un pēc tam ievietojiet plūsmas elementu.
5. Aizveriet plūsmas elementa aizbīdņi un plūsmas elementa nodalījuma durvis.

Pirms izpildes uzsākšanas gan aizbīdnim, gan nodalījuma durvīm jābūt aizvērtiem. Kad plūsmas elements ir ievietots, programmatūra nolasa un reģistrē RFID. Ekrāna apakšējā labajā stūrī parādās apstiprinājums, ka RFID ir veiksmīgi nolasīts.

6. Izpildiet programmatūras norādījumus, lai ievietotu MiSeqDx SBS šķīduma (PR2) pudeli, pārliecinieties, ka atkritumu pudele ir tukša, un ievietojiet reaģentu kasetni.

Kad ievietota MiSeqDx SBS šķīduma (PR2) pudele un reaģentu kasetne, programmatūra nolasa un reģistrē RFID. Ekrāna apakšējā labajā stūrī parādās apstiprinājums, ka RFID ir veiksmīgi nolasīts.

7. Kad tiek uzsākta izpilde, tiek atvērts sekvencēšanas ekrāns. Šajā ekrānā ir redzama notiekošā izpilde, tostarp intensitātes un kvalitātes novērtējumi (Q-scores).

## Rezultāti

Real-Time Analysis (RTA) ir integrēta programmatūra, kas veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze ir pabeigta, MiSeqDx iekārtas modulis, kas atlasīts darbībā [Izpildes izveidošana ar Local Run Manager, 7. lpp](#) sāk sekundāro analīzi. Informāciju par citām darbplūsmām skatiet analīzēm specifiskā dokumentācijā.

## Kvalitātes kontroles procedūras

MiSeqDx programmatūra novērtē katru izpildi, paraugu un bāzu nosaukšanu, salīdzinot to ar kvalitātes kontroles metriku. Kad tas ir nepieciešams, gaidītajiem rezultātiem ir jānovērtē arī pozitīvās un negatīvās kontroles, kas ietvertas bibliotēkas sagatavošanā.

## Veiktspējas raksturlielumi

Visi pētījumi tika veikti ar MiSeqDx.

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

Testēšana aptver paraugu caurlaidspējas diapazonus, ko atbalsta MiSeqDx reaģentu komplekts v3 Micro. Atkarībā no testa MiSeqDx var atbalstīt 1–96 paraugus vienā izpildē. MiSeqDx reaģentu komplekts v3 Micro ir izstrādāts, lai atbalstītu zemāku paraugu caurlaidspēju šajā diapazonā atlasīto testu ietvaros.

Somatiskajos pētījumos tika izmantots TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ar MiSeqDx reaģentu komplekts v3. Dzimumšūnas līnijas vai somatiskajai darbplūsmai, kas aprakstīta TruSeq pielāgoto amplikonu komplektā Dx, lai sagatavotu bibliotēkas sekvenčēšanai, sekoja analīze, izmantojot attiecīgi moduli Germline Variant Module vai Somatic Variant Module, ar diviem izņēmumiem. Pētījumos, izmantojot reprezentatīvas mutācijas paneļus, izmantojot vienu gēnu (dzimumšūnas līnijas veikspēja; MiSeqDx cistiskās fibrozes 139 variantu pētījums) vai divus gēnus (somatiskā veikspēja), izmantoja testēšanai specifiskas darbplūsmas un analīzes moduļus.

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

## Veiktspējas raksturlielumiem izmantoto aprēķinu definīcijas

- Pozitīvā procentuālā sakritība (PPA) tiek aprēķināta kā proporcija ar analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā variantus.
  - $(\text{testos pareizi ziņoto variantu lokāciju skaits}) / (\text{kopējais variantu lokāciju skaits})$   
Analīzes ziņotie variantu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi pozitīvi (TP). Variantu lokusi, kurus analīze ziņo kā atsaucē noteikšanas gadījumus vai kā atšķirīgus variantu noteikšanas gadījumus, ir aplami negatīvi (FN)
- Negatīvā procentuālā sakritība (NPA) tiek aprēķināta kā proporcija ar analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā savvaļas tipus.
  - $(\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits}) / (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits})$   
Analīzes ziņotie savvaļas tipu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi negatīvi (TN). Savvaļas tipu lokācijas, kuras tests ir ziņojis kā variantus, ir nepatiesi pozitīvi (FP).
- Vispārējā procentuālā sakritība (OPA) tiek aprēķināta kā proporcija no analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem pret standartmetodi.
  - $((\text{analīzes pareizi ziņoto variantu lokusu skaits}) + (\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits})) / ((\text{kopējais variantu lokusu skaits}) + (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits}))$
- Variantu nosaukšanas lietojumiem PPA, NPA un OPA aprēķinos nav iekļauti nenoteikšanas gadījumi (kad varianta vai atsaucē lokuss neatbilst vienam vai vairākiem kvalitātes filtriem). Divu pētījumu pareizu noteikšanas gadījumu procentuālā apjoma metrikā ir īpaši iekļauti nenoteikšanas gadījumi, un šī nenoteikšanas gadījumu iekļaušana ir atzīmēta piemērojamajās tabulās.
- Noteikšanas koeficients tiek aprēķināts kā filtrus izturējušo lokusu kopējais skaits, dalīts ar kopējo skaitu pozīciju, kuras ir sekvenčētas 1–22. hromosomai. Hromosomas X un Y tiek izslēgtas. Šajā metrikā nav ņemta vērā noteikšanas atbilstība atsaucē metodei.

Par veiktspējas raksturlielumiem, kas saistīti ar pirmsanalītiskajiem faktoriem (piemēram, ekstrakcijas metodēm vai DNS ievadēm), skatiet lietošanas pamācību atbilstoši piemērojamajai bibliotēkas sagatavošanas metodei.

## Paraugu indeksēšana

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

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

Tika testēti divpadsmit parauga replikāti (24 bibliotēkas), lai izmērītu indeksa precizitāti ar somatiskajiem variantiem frekvencēs no 0,05 līdz 0,10, izmantojot moduli Somatic Variant Module (somatiskajai noteikšanai tiek izmantotas divas indeksēšanas kombinācijas katram replikātam). PPA bija 100 % SNV (64/64), ievietojumiem (11/11) un dzēsumiem (19/19). NPA bija 100 % (vismaz 11 590 atsaucēs pozīcijas katrai indeksēšanas kombinācijai) visām indeksēšanas kombinācijām.

## Paraugu pārnešana

Iekārtas MiSeqDx darbplūsmas ietver bibliotēkas sagatavošanu un vienlaicīgu vairāku paraugu sekvencēšanu un kontroļu apstrādi. Paraugu pārnešanas pētījums tika veikts, lai novērtētu, vai testa rezultātus ietekmē nepatiesi pozitīvi rezultāti, kas saistīti ar piesārņošanu pārnešanas laikā starp iedobēm, sagatavojot paraugu bibliotēku, kā arī piesārņošanu starp izpildes reizēm, veicot secīgas sekvencēšanas izpildes. Tika izmantoti somatiski varianti, jo tos var noteikt zemākos alēles biežuma notikumos nekā dzimumšūnu variantus.

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

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

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

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

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

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

## Dzimumšūnas veiktspējas raksturlielumi

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

### Precizitāte

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

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

Tabula 1 MiSeqDx iekārtas bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība katrā paraugā

Paraugšs	Vidējais noteikšanas rādītājs	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais FN variantu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	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
NA12879	>99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	>99,9

Paraugs	Vidējais noteikšanas rādītājs	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais FN variantu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	PPA	NPA	OPA
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

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

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

Tabula 2 MiSeqDx iekārtas precizitāte amplikonu līmenī

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indels	0,22	2232	0	0	100
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indels	0,4	2184	0	0	100
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indels	0,49	2208	0	0	100
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indels	0,28	2160	0	0	100
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indels	0,38	1920	0	0	100
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	Nav	0,65	1944	0	0	100
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Nav	0,43	2232	0	0	100
16	2	235 016 350	23 5016 422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indels	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	Nav	0,43	1992	0	0	100
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indels	0,49	1680	0	0	100
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indels	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100



Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	Nav	0,29	1872	0	0	100
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882 081	1882 158	78	75	Nav	0,78	1800	0	0	100
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	Nav	0,39	1536	0	0	100
31	5	74 477 114	74 077 196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indels	0,43	1800	0	0	100
35	6	6 318 713	6 318 814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indels	0,63	2208	0	0	100
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indels	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indels	0,53	2280	0	0	100
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	Nav	0,44	1752	0	0	100
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indels	0,35	2112	0	0	100
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indels	0,38	2040	0	0	100
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	Nav	0,31	1584	0	0	100
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indels	0,35	2232	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
51	8	1817 312	1817 394	83	83	Nav	0,42	1992	0	0	100
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indels	0,3	1608	0	0	100
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indels	0,32	1560	0	0	100
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	Nav	0,49	2304	0	0	100
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indels	0,35	2280	0	0	100
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indels	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	Nav	0,49	1920	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Nav	0,51	1944	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Nav	0,45	2304	0	0	100
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indels	0,46	1680	0	0	100
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	Nav	0,65	2400	0	0	100
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indels	0,37	1488	0	0	100
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Nav	0,59	2448	0	0	100
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	Nav	0,42	2040	0	0	100
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indels	0,53	2040	0	0	100
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	Nav	0,49	1944	0	0	100
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	Nav	0,52	1752	0	0	100
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indels	0,49	2136	0	0	100
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indels	0,39	1848	0	0	100
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	Nav	0,25	1992	0	0	100
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indels	0,38	1944	0	0	100
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indels	0,35	2184	0	0	100
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indels	0,62	2256	0	0	100
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indels	0,25	1632	0	0	100
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indels	0,65	1704	0	0	100
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	Nav	0,36	2184	0	0	100
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indels	0,56	1680	0	0	100
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	Nav	0,27	1512	0	0	100
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indels	0,37	2184	0	0	100
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	39 70 090	3 970 180	91	91	Indels	0,46	2184	0	0	100
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indels	0,26	2232	0	0	100
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indels	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	Nav	0,37	2184	0	0	100
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indels	0,47	1944	0	0	100
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indels	0,45	2040	0	0	100
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Nav	0,48	1560	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	Nav	0,59	2376	0	0	100
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Nav	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Nav	0,64	1680	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	Nav	0,61	2256	0	0	100
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
130	20	21766 821	21766 890	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	1680	0	0	100
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indels	0,63	2424	0	0	100
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indels	0,36	1608	0	0	100
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indels	0,57	2088	0	0	100
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indels	0,35	1584	0	0	100
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indels	0,39	2088	0	0	100
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indels	0,63	2400	0	0	100
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	Nav	0,68	2328	0	0	100
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indels	0,46	2328	0	0	100
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	Nav	0,6	2376	0	0	100
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indels	0,66	2208	0	0	100
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	Nav	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	Nav
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	Nav
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nav

Varianti, kas bija nenoteikšanas gadījumi, ir apkopoti [Tabula 3](#). Konkrētie filtri, kas izraisīja beznoteikšanas gadījumus, ir uzskaitīti tabulā. Ievietošana amplikonā 111 tika filtrēta deviņos no 16 gadījumos, atlikušos septiņus gadījumus nosakot kā atsauci un tāpēc viltus negatīvus (FN).

Tabula 3 Nenoteikšanas gadījumu variantu kopsavilkums

Amplikons Nr.	Rakst.: Poz	Variants	Atbilstošais amplikona saturs	Filtrs	Izlaistie varianti	Paredzjamie varianti	FN noteikšana
64	10:55 892 600	TAC > T	AC (11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39 589 692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: atkārtot filtru. Variants ir filtrēts, ja viss variants vai tā daļa atkārtoti parādās atsaucēs genomā blakus varianta pozīcijai. Nepieciešami vismaz deviņi atkārtojumi atsaucē, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 5 bp.

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

Tabula 4 Iekārtas bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība NIST datu bāzei attiecībā uz NA12878 paraugu

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas rādītājs	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais FN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100

Paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu nelielus ievietojumus un delēcijas (indelus) ([Tabula 5](#)). Dažos gadījumos indels bija izplatīts starp diviem vai vairākiem paraugiem, kā tas atspoguļots slejā Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu. Rezultāti abiem 12 derīgo paraugu replikātiem ir iekļauti [Tabula 5](#). Pavisam bija 71 indels, un šo indelu lielums bija diapazonā 1–24 bp ievietojumiem un 1–25 bp dzēsumiem. 69 indelos katrā tika konstatēta 100 % pozitīva procentuālā sakritība. Vienai delēcijai (64. amplikons; 2 bp delēcijai (chr10 55 892 600 TAC>T) nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo katrs no šiem variantiem R5x9 filtra dēļ nebija noteikšanas gadījums. Tāpēc PPA, kas izslēdz gadījumus bez noteikšanas, nevarēja aprēķināt. Vēl vienai delēcijai, 1 bp insercijai (chr17 39 589 692 C>CA 111. amplikonā) arī nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo deviņi varianti nebija noteikšanas gadījumi R5x9 filtra dēļ un septiņi bija FN noteikšanas gadījumi.

Tabula 5 Kopsavilkums par delēciju noteikšanu ar iekārtu MiSeqDx

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
1	1	36 450 544	93	25 bp dzēsums	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109 465 165	79	3 bp dzēsums	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218 353 908	91	23 bp ievietojums	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223 906 701	92	17 bp dzēsums	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236 372 081	70	5 bp ievietojums	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247 812 083	88	3 bp ievietojums	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55 862 804	90	7 bp ievietojums	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87 003 972	80	6 bp dzēsums	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200 796 749	87	5 bp ievietojums	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212 245 090	91	12 bp ievietojums	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235 016 388	73	2 bp ievietojums	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4 466 274	93	23 bp dzēsums	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49 851 375	70	9 bp ievietojums	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190 106 071	75	1 bp dzēsums	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56 236 567	66	8 bp dzēsums	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164 446 785	62	11 bp ievietojums	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74 077 155	83	4 bp dzēsums	TAGTA>T	10	0	0	10	100

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
34	5	155 662 255	75	8 bp ievietojums	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24 950 035	92	21 bp dzēsums	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31 084 942	100	3 bp dzēsums	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32 986 905	95	25 bp dzēsums	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41 647 442	95	23 bp dzēsums	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66 276 142	88	1 bp ievietojums	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110 939 983	85	4 bp dzēsums	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128 533 514	90	1 bp ievietojums	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149 503 916	91	4 bp dzēsums	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156 476 548	93	11 bp dzēsums	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24 811 064	90	1 bp dzēsums	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76 518 677	67	4 bp ievietojums	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105 586 193	65	4 bp ievietojums	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138 995 370	97	21 bp dzēsums	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5 987 158	79	3 bp dzēsums	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45 084 202	95	16 bp dzēsums	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55 892 600	89	2 bp dzēsums	TAC>T	10	10	0	0	Nav
68	11	30 177 690	70	2 bp ievietojums	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59 837 721	62	8 bp ievietojums	T>TTATGAAA	12	0	0	12	100



Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
75	11	118 406 328	85	8 bp dzēsums	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120 357 842	85	2 bp dzēsums	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2 834 814	84	21 bp ievietojums	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25 817 002	89	19 bp ievietojums	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44 880 152	89	4 bp ievietojums	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77 665 265	77	20 bp dzēsums	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46 958 967	73	22 bp dzēsums	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58 050 081	81	4 bp ievietojums	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82 390 602	91	16 bp dzēsums	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102 808 554	94	5 bp dzēsums	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63 446 199	68	6 bp dzēsums	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77 879 862	95	25 bp dzēsums	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85 438 311	72	3 bp ievietojums	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89 864 316	70	4 bp ievietojums	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85 706 416	91	7 bp dzēsums	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3 594 276	87	1 bp dzēsums	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3 970 133	91	18 bp ievietojums	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16 084 985	93	4 bp ievietojums	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39 589 692	84	1 bp ievietojums	C>CA	16	9	7	0	0

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
112	17	39 589 739	84	24 bp ievietojums	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45 438 886	92	4 bp dzēsums	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61 502 459	79	12 bp dzēsums	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38 837 054	75	22 bp ievietojums	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47 405 425	81	3 bp ievietojums	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54 815 706	85	2 bp dzēsums	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21 766 863	70	15 bp dzēsums	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25 278 464	101	5 bp ievietojums	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50 897 361	67	11 bp ievietojums	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62 690 925	87	16 bp dzēsums	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30 300 873	66	11 bp ievietojums	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36 710 749	87	21 bp dzēsums	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46 644 985	69	5 bp dzēsums	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25 750 814	100	6 bp ievietojums	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37 409 885	97	5 bp ievietojums	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47 081 407	92	10 bp dzēsums	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Reproducējamība

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu MiSeqDx iekārtas reproducējamību ar šūnu līnijām (1. un 2. pētījums) vai asinīm, kurās samazināts lekocītu skaits un kas papildinātas ar šūnu līnijām (2. pētījums). 1. pētījumā izmantoti vairāki instrumenti. 2. pētījums notika vairākās vietās.

### 1. pētījums

Iekārtas MiSeqDx reproducējamība tika noteikta, izmantojot divus iekārtas, divus operatorus un divas reaģentu partijas kopumā astoņās izpildēs. Reprezentatīvās analīzes, paraugi un atsaucis metode ir tie paši, kas aprakstīti precizitātes pētījumā.

Rezultāti parādīti katrai iekārtai uz amplikona bāzes [Tabula 6](#), lai demonstrētu noteikšanas reproducējamību starp iekārtām. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālais daudzums ietvēra gan nepareizas noteikšanas, gan nenoteikšanas gadījumus (variantu noteikšanai nav sasniegti viena vai vairāku filtru izpildes nosacījumi). Instrumenti ģenerēja līdzīgu beznoteikšanas gadījumu un kļūdainu noteikšanu atkarībā no konkrētā amplikona.

Tabula 6 Reproducējamības pētījuma starp iekārtām rezultāti MiSeqDx iekārtai (amplikonu līmenis)

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indels	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indels	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indels	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indels	0,28	8640	0	0	8640	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indels	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	Nav	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Nav	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235 016 350	23 5016 422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indels	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	Nav	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indels	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indels	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	Nav	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882 081	1882 158	78	75	Nav	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069 808	41069 871	64	64	Nav	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74 477 114	74 077 196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indels	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indels	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084 900	31084 999	100	94	GCT(5), indels	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indels	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647 401	41647 495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	Nav	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indels	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indels	0,38	8160	0	0	8160	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	Nav	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indels	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817 312	1817 394	83	83	Nav	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indels	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indels	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	Nav	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indels	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indels	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	Nav	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Nav	0,51	7776	0	0	7776	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Nav	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indels	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	Nav	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indels	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Nav	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	Nav	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indels	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	Nav	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	Nav	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indels	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indels	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	Nav	0,25	7968	0	0	7968	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indels	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indels	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indels	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indels	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indels	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	Nav	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indels	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	Nav	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	39 70 090	3 970 180	91	91	Indels	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indels	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0



Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indels	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	Nav	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indels	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indels	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Nav	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625 143	625 241	99	99	Nav	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Nav	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Nav	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746 056	746 149	94	94	Nav	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3), TG (4), indels	0,46	6720	0	0	6720	0	0

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indels	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indels	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indels	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indels	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indels	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indels	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	Nav	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indels	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	Nav	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indels	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	Nav	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

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

Tabula 7 Iekārtas MiSeqDx rezultāti starp operatoriem

Atšķirīgs biežuma diapazons	Unikālo variantu skaits	1. operatora analizēto variantu skaits	2. operatora analizēto variantu skaits	1. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums	2. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums
Homozigots (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigots (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Katra parauga reproducējamības pētījumu rezultāti ir parādīti, apvienojot tos no visām astoņām izpildēm (Tabula 8). Noteikšana tiek vērtēta katram variantu tipam – SNV, insercijām un delēcijām – atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas. Šī analīze parādīja, ka variantu rezultāti bija reproducējami paraugos.

Tabula 8 Iekārtas MiSeqDx bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība katrā paraugā

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

Šajā reproducējamības pētījumā sniegto astoņu izmēģinājumu dati apstiprina apgalvojumu, ka iekārta MiSeqDx spēj konsekventi sekvecēt:

- GC saturs  $\geq 19\%$  (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem ar  $19\%$  pareizi noteiktu GC saturu un nenoteikšanas gadījumu biežumu  $1,1\%$ )
- GC saturs  $\leq 78\%$  (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem ar  $78\%$  GC saturu, pareizi noteiktiem un bez noteiktiem)
- PolyA garums  $\leq 8$  (8 nukleotīdu PolyA atkātojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem, kas satur PolyA = 8)
- PolyT garums  $\leq 10$  (10 nukleotīdu PolyT atkātojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem, kas satur PolyT = 10)
- PolyG garums  $\leq 7$  (7 nukleotīdu PolyG atkātojums tika pareizi noteikts 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem, kas satur PolyG = 7)
- PolyC garums  $\leq 6$  (PolyC atkātojums no 6 nukleotīdiem tika pareizi noteikts 576 no 576 sekvecētiem amplikoniem, kas satur PolyC = 6)
- Dinukleotīdu atkārtotās garums ir  $\leq 11x$  (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem ar  $11x$  dinukleotīdu atkātojumiem tika noteiktas pareizi ar beznoteikšanas biežumu  $0,5\%$ )
- Trinukleotīdu atkārtotās garums ir  $\leq 5x$  (visas noteiktās bāzes 192 no 192 sekvecētiem amplikoniem ar  $5x$  trinukleotīdu atkātojumu pareizi noteiktas ar  $0,5\%$  beznoteikšanas biežumu)
- 24 vai mazāk bāzes ievietošanu un 25 vai mazāk bāzes dzēšanu
  - 24 bāzes ievietošanu tika pareizi noteikti 192 no 192 paraugiem
  - 25 bāzes dzēšanu pareizi noteica 223 paraugos un nepareizi noteica 1 paraugā no 224 paraugiem

## 2. pētījums

Reproducējamības starp dažādām laboratorijām pētījums tika veikts, izmantojot reprezentatīvu testu, Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay (cistiskās fibrozes 139 variantu tests), ietverot *CFTR* klīniski nozīmīgu ģenētisko variāciju apakškopu, kas analizēta ar MiSeq Reporter programmatūru, izmantojot uz MiSeqDx platformu orientētu DNS sekvecēšanas darbplūsmu. Aklajā pētījumā tika izmantotas 3 izmēģinājumu vietas un 2 operatori katrā vietā. Katrā vietā katrs operators testēja nodalījumam raksturīgus 46 paraugu paneļus, kopā 810 noteikšanas vienā vietā. Paneļi saturēja sajaukumu no genoma DNS no šūnu līnijām ar zināmajiem variantiem *CFTR* gēnā, kā arī no leukocītiem atbrīvotas asinis, kam pievienotas šūnu līnijas ar zināmiem *CFTR* gēna variantiem. Asins paraugi tika

piegādāti, lai ļautu ietvert ekstrakcijas soļus, ko izmanto, lai sagatavotu gDNS, kas kalpo par galveno ievadi analīžu darbplūsmā. Paraugu atbilstības koeficients, kas definēts kā paraugu skaits, kas atbilst QC metrikai pirmajā mēģinājumā, bija 99,88 %. Visu testa rezultātu pamatā ir sākotnējā testēšana.

Tabula 9 Rezultātu kopsavilkums attiecībā uz reproducējamības pētījumu, kas veikts, izmantojot reprezentatīvo MiSeqDx cistiskās fibrozes 139-variantu testu

Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+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

Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C neparādās	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
A	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	Nav	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100

Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
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



Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	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 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nav	100	100

Panelis	Parauga Nr.	Genotipa paraugs	Varianti	Kopējais noteikšanu skaits vienā vietā	Pozitīva atbilstoša noteikšana (varianti)			Negatīva atbilstoša noteikšana (savvaļas tips)			Kļūdainu noteikšanu skaits	Beznoteikšanas gadījumu skaits	Pozitīva atbilstība (%)	Negatīva atbilstība (%)	Kopējā atbilstība (%)
					1. vieta	2. vieta	3. vieta	1. vieta	2. vieta	3. vieta					
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Kopā				74 556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

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

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

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

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

## Somatiskās veiktspējas raksturlielumi

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

### Precizitāte

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

### 1. pētījums

Pētījumā tika izmantotas reprezentatīvās analīzes, kas izstrādātas, lai apšaubītu dažādus gēnus, kas aptver 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās, izmantojot 150 amplikonus. Y hromosomā nav uzticamu reģionu, un tā netika izvērtēta. Šajā pētījumā izmantotie pieci unikālie paraugi nāk no vienas ģimenes — diviem vecākiem un trīs bērniem —, kurus sekvencēšanā bieži izmanto vairākās laboratorijās un sekvencēšanas metodoloģijās. Trīs paraugi ir no sievietēm un divi no vīriešiem. Pirms DNS ekstrahēšanas pētījumam visi paraugi tika

fiksēti formalīnā un iegulti parafīnā. Paraugs GM12877 DNS līmenī tika atšķaidīts ar paraugu GM12878, lai izveidotu GM12877-D un izstrādātu variantu kopu ar frekvencēm tuvu 5 % un 10 %. Katrs no paraugiem tika testēts divos eksemplāros, izņemot GM12877-D, kas tika testēts ar pieciem replikātiem. Precizitāte tika noteikta atsevišķu nukleotīdu variantiem (SNV), ievietojumiem un dzēsumiem, salīdzinot pētījuma datus ar nodalījumam raksturīgu atsauces datu bāzi. Atsauces datu bāzes sekvenca (Platinum Genomes versija 2016-01) tika iegūta no vairāku sekvenčēšanas metodoloģiju kombinācijas, publiski pieejamiem datiem un informācijas par iedzimtību. Uzticami genoma reģioni tika definēti, pamatojoties uz šo atsauces metodi, ja vien nav norādīts citādi. Kopumā paraugi tika analizēti astoņas reizes. Tabulas, kas parādītas, lai demonstrētu precizitāti, ir balstītas uz pirmā piegājiena datiem.

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

**Tabula 10** MiSeqDx iekārtas bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība atsauces datiem attiecībā uz 6 labi raksturotiem paraugiem

Paraugšs	Vidējais noteikšanas rādītājs	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais FN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	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 <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>	98,4	155	155	0	57 608	100	100	100

<sup>1</sup> Variants ar frekvenci, kas lielāka par 20 %.

<sup>2</sup> Variants ar frekvenci, kas mazāka par 20 %.

Tika izstrādāti 150 amplikoni, lai aptvertu dažādu genoma saturu. Amplikonu GC saturs svārstījās no 26 līdz 87 %. Amplikoniem bija arī virkne atsevišķu nukleotīdu (piemēram, PolyA, PolyT), dinukleotīdu un trinukleotīdu atkārtojumu. Testā tika izmantoti 6 unikāli paraugi. Dati tika apkopoti, par pamatu izmantojot amplikonus (**Tabula 11**), lai noteiktu genoma satura ietekmi uz pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālo daudzumu veido variantu un atsauces noteikšanas gadījumi, un, ja pastāv nepareizas noteikšanas vai nenoteikšanas gadījumi, tas ir mazāks par 100 %. Noteikšana nenotiek, ja variantu noteikšanai nav izpildīts viens vai vairāki filtri (piemēram, nepietiekams pārklājums). Nebija nepareizu noteikšanu. Beznoteikšanas gadījumu skaits amplitūdās ievērojami atšķīrās. GC saturs un vairākas mijiedarbības ar GC saturu bija visnozīmīgākie beznoteikšanas gadījumu prognozētāji. 2040/2580 (79 %) no beznoteikšanas gadījumiem bija saistīti ar pārklājuma specifiskācijas neatbilstību. Amplikoni, kuru GC

saturs pārsniedz 78 %, izsauca visvairāk beznoteikšanas gadījumu. Reprezentatīvajā amplikonā ar 78 % GC saturu kopumā 675 noteikšanas gadījumu nenotika. Reprezentatīvā amplikonā ar 87 % bija 1365 beznoteikšanas gadījumu. Pārklājumu var palielināt, samazinot paraugu skaitu, kas ielādēti plūsmas šūnā, un tas var ļaut noteikt amplikonus ar augstu GC saturu.

Tabula 11 Amplikonu līmeņa precizitātes dati

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indels	0,22	1395	0	0	100
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indels	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indels	0,49	1380	0	0	100
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indels	0,28	1350	0	0	100
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indels	0,38	1200	0	0	100
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	Nav	0,65	1215	0	0	100
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Nav	0,43	1395	0	0	100
16	2	235 016 350	23 5016 422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indels	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	Nav	0,43	1245	0	0	100
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indels	0,49	1050	0	0	100
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indels	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	Nav	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	Nav	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	Nav	0,39	960	0	0	100
31	5	74 477 114	74 077 196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indels	0,43	1125	0	0	100
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indels	0,63	1380	0	0	100
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indels	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indels	0,53	1425	0	0	100
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	Nav	0,44	1095	0	0	100
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indels	0,35	1320	0	0	100
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indels	0,38	1275	0	0	100
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	Nav	0,31	990	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indels	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817 312	1 817 394	83	83	Nav	0,42	1245	0	0	100
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indels	0,3	1005	0	0	100
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indels	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	Nav	0,49	1440	0	0	100
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indels	0,35	1425	0	0	100
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indels	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	Nav	0,49	1200	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Nav	0,51	1215	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Nav	0,45	1440	0	0	100
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indels	0,46	1050	0	0	100
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	Nav	0,65	1500	0	0	100
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indels	0,37	930	0	0	100
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Nav	0,59	1530	0	0	100
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	Nav	0,42	1275	0	0	100
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indels	0,53	1275	0	0	100
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	Nav	0,49	1215	0	0	100
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24 167 504	24 167 576	73	73	Nav	0,52	1095	0	0	100
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indels	0,49	1335	0	0	100
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indels	0,39	1155	0	0	100
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	Nav	0,25	1245	0	0	100
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indels	0,38	1215	0	0	100
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indels	0,35	1365	0	0	100
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indels	0,62	1410	0	0	100
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indels	0,25	1020	0	0	100
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indels	0,65	1065	0	0	100
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	Nav	0,36	1365	0	0	100
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indels	0,56	1050	0	0	100
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	Nav	0,27	945	0	0	100
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
103	16	3 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indels	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	39 70 090	3 970 180	91	91	Indels	0,46	1365	0	0	100
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indels	0,26	1395	0	0	100
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indels	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	Nav	0,37	1365	0	0	100
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indels	0,47	1215	0	0	100
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indels	0,45	1275	0	0	100
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Nav	0,48	975	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	Nav	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Nav	0,68	1110	0	0	100
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Nav	0,64	1050	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	Nav	0,61	1410	0	0	100
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100



Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Kopējais pareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizo noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	% pareizu noteikšanas gadījumu
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766 821	21766 890	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	1050	0	0	100
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indels	0,63	1515	0	0	100
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indels	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indels	0,57	1305	0	0	100
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indels	0,35	990	0	0	100
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indels	0,39	1305	0	0	100
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indels	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	Nav	0,68	1455	0	0	100
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indels	0,46	1455	0	0	100
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	Nav	0,6	1485	0	0	100
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indels	0,66	1380	0	0	100
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	Nav	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	Nav
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	Nav
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nav

Varianti, kas bija nenoteikšanas gadījumi, ir apkopoti [Tabula 12](#). Konkrētie filtri, kas izraisīja beznoteikšanas gadījumus, ir uzskaitīti tabulā.

Tabula 12 Nenoteikšanas gadījumu variantu kopsavilkums

Amplikons Nr.	Rakst.: Poz	Variants	Atbilstošais amplikona saturs	Filtrs	Izlaistie varianti	Paredzamie varianti
28	5:1882 129	T > G	78 % GC	ZemsDP <sup>1</sup>	8	13
52	8:24 811 064	AG > A	PolyG (7), CTC (4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11 784 633	C > T	PolyGC (3), 87 % GC	ZemsDP	13	13
64	10:55 892 600	TAC > T	AC (11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39 589 692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP: zems pārklājums. Variants tiek filtrēts, ja dziļums vismaz vienā no kopām šajā konkrētajā pozīcijā ir zem 900.

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

Parauga šūnu līnijai sekvencēšanas rezultāti tika salīdzināti ar ļoti pārliecinošu genotipu NA12878 genomam, ko noteica Nacionālais standartu un tehnoloģijas institūts (NIST) (v.2.19). No 150 amplikoniem 92 amplikoni bija pilnībā iekļauti ļoti uzticamajos genoma reģionos, 41 amplikonam bija daļēja pārklāšanās un 17 amplikoniem NIST sekvencē nebija pārklāšanās. Rezultātā tika iegūti 10 000 koordinātu vienā replikātā salīdzināšanai. Nevariantu bāzu noteikšanas gadījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma atsaucē sekvences uzbūvi hg19. Precizitātes rezultāti ir parādīti [Tabula 13](#).

Tabula 13 MiSeqDx iekārtas bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība NIST atsaucēi GM12878 paraugam

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas rādītājs	Kopējais TP variantu noteikšanu skaits	Kopējais FN variantu noteikšanu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

Pieci neatšķaidītie paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu mazos ievietojumus un delēcijas (indelus) ([Tabula 14](#)). Dažos gadījumos indels bija izplatīts starp diviem vai vairākiem paraugiem, kā tas atspoguļots slejā Kopējais parauga replikātu skaits ar indelu. Rezultāti abiem piecu paraugu replikātiem ir iekļauti [Tabula 14](#). Pavisam bija 71 delēcija, un šo delēciju lielums bija diapazonā 1–24 bp ievietojumiem un 1–25 bp delēcijām. 68 delēcijās katrā tika konstatēta pozitīva procentuālā atbilstība – 1. Trijiem ievietojumiem un delēcijām nebija pareizu noteikšanas gadījumu, jo katram no šiem variantiem R3x6 filtra dēļ nebija noteikšanas gadījuma. Tāpēc nevarēja aprēķināt PPA, kas izslēdz noteikšanas gadījumus. Trīs variantos bija 1 bp delēcija (chr8 24 811 064 AG>A); 2 bp delēcija (chr10 55 892 600 TAC>T) un 1 bp ievietojums (chr17 39 589 692 C>CA).

Tabula 14 Kopsavilkums par indela noteikšanu ar instrumentu MiSeqDx

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indeli	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
1	1	36 450 544	93	25 bp dzēsums	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109 465 165	79	3 bp dzēsums	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218 353 908	91	23 bp ievietojums	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223 906 701	92	17 bp dzēsums	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236 372 081	70	5 bp ievietojums	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247 812 083	88	3 bp ievietojums	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55 862 804	90	7 bp ievietojums	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87 003 972	80	6 bp dzēsums	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200 796 749	87	5 bp ievietojums	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212 245 090	91	12 bp ievietojums	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235 016 388	73	2 bp ievietojums	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4 466 274	93	23 bp dzēsums	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49 851 375	70	9 bp ievietojums	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190 106 071	75	1 bp dzēsums	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56 236 567	66	8 bp dzēsums	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164 446 785	62	11 bp ievietojums	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74 077 155	83	4 bp dzēsums	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155 662 255	75	8 bp ievietojums	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indeli	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
36	6	24 950 035	92	21 bp dzēsums	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31 084 942	100	3 bp dzēsums	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32 986 905	95	25 bp dzēsums	CTTTCACTTTCCCCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41 647 442	95	23 bp dzēsums	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66 276 142	88	1 bp ievietojums	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110 939 983	85	4 bp dzēsums	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128 533 514	90	1 bp ievietojums	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149 503 916	91	4 bp dzēsums	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156 476 548	93	11 bp dzēsums	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24 811 064	90	1 bp dzēsums	AG>A	15	15	0	0	Nav
53	8	76 518 677	67	4 bp ievietojums	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105 586 193	65	4 bp ievietojums	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138 995 370	97	21 bp dzēsums	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5 987 158	79	3 bp dzēsums	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45 084 202	95	16 bp dzēsums	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55 892 600	89	2 bp dzēsums	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30 177 690	70	2 bp ievietojums	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59 837 721	62	8 bp ievietojums	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118 406 328	85	8 bp dzēsums	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120 357 842	85	2 bp dzēsums	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2 834 814	84	21 bp ievietojums	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indeli	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
84	13	25 817 002	89	19 bp ievietojušs	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44 880 152	89	4 bp ievietojušs	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77 665 265	77	20 bp dzēsums	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46 958 967	73	22 bp dzēsums	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58 050 081	81	4 bp ievietojušs	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82 390 602	91	16 bp dzēsums	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102 808 554	94	5 bp dzēsums	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63 446 199	68	6 bp dzēsums	CAA AATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77 879 862	95	25 bp dzēsums	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85 438 311	72	3 bp ievietojušs	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89 864 316	70	4 bp ievietojušs	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85 706 416	91	7 bp dzēsums	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3 594 276	87	1 bp dzēsums	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3 970 133	91	18 bp ievietojušs	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16 084 985	93	4 bp ievietojušs	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39 589 692	84	1 bp ievietojušs	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39 589 739	84	24 bp ievietojušs	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45 438 886	92	4 bp dzēsums	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61 502 459	79	12 bp dzēsums	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100

Amplikons	Hromosoma	Pozīcija	Analizētā fragmenta lielums	Amplikona indela tips un garums	Indels	Kopējais parauga replikātu skaits ar indeli	Neesošu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais nepareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	Kopējais pareizu indelu noteikšanas gadījumu skaits	PPA
120	18	38 837 054	75	22 bp ievietojušs	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47 405 425	81	3 bp ievietojušs	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54 815 706	85	2 bp dzēsums	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21 766 863	70	15 bp dzēsums	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25 278 464	101	5 bp ievietojušs	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50 897 361	67	11 bp ievietojušs	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62 690 925	87	16 bp dzēsums	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30 300 873	66	11 bp ievietojušs	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36 710 749	87	21 bp dzēsums	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46 644 985	69	5 bp dzēsums	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25 750 814	100	6 bp ievietojušs	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37 409 885	97	5 bp ievietojušs	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47 081 407	92	10 bp dzēsums	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## 2. pētījums

Šajā pētījumā tika izmantoti audu bankas FFPE kolorektālā vēža audu paraugi un reprezentatīvais divu gēnu tests, kas tika salīdzināti ar atsauces metodi, divvirzienu Sanger sekvencēšanu (Sanger). No pavisam 1183 subjektiem 441 subjektam bija derīgi Sangera un reprezentatīvo analīžu rezultāti. Izvērtēti pētāmās personas līmenī ([Tabula 15](#)), 230 no 441 pētāmajām personām bija pozitīvs rezultāts, izmantojot Sanger (Sanger noteikta mutācija). No tiem 227 bija pozitīvi, izmantojot reprezentatīvās analīzes. Atlikušais 211 no 441 subjekta bija negatīvs, izmantojot Sangeru (Sangers nenoteica mutāciju). No tiem 206 bija negatīvi, izmantojot reprezentatīvās analīzes. Tā rezultātā tika panākta pozitīva procentuālā atbilstība (PPA) — 98,7 % un negatīva procentuālā atbilstība (NPA) — 97,6 % ([Tabula 15](#)).

Tabula 15 Rezultātu pozitīvā un negatīvā procentuālā atbilstība petāmās personas līmenī

Reprezentatīvas analīzes	Sangers		Kopā
	Pozitīvs	Negatīvs	
Pozitīvs	227 <sup>1</sup>	5	232
Negatīvs	3 <sup>2</sup>	206	209
Kopā	230	211	441

Veiktspēja Kopsavilkums		
Atbilstība Statistika	Brīža novērtēšana	Precīza 95 % CI
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

<sup>1</sup>Tika novērotas 224 tiešas atbilstības subjekta iekšienei, visu mutāciju līmeņa rezultātiem. Diviem subjektiem MiSeqDx noteica Sangera noteikto mutāciju un vienu papildu mutāciju. Vienam subjektam MiSeqDx un Sangers noteica dažādas mutācijas.

<sup>2</sup>Vienam subjektam Sangers noteica divas mutācijas. Diviem subjektiem Sangers noteica vienu mutāciju.

### 3. pētījums

Šajā pētījumā tika vērtētas DNS bibliotēkas, kas sagatavotas ar FFPE eksemplāriem vairākos audu tipos. Kopā 109 FFPE paraugi no astoņiem dažādiem audiem (resnās zarnas, olnīcu, aizkuņģa dziedzera, virsnieru, urīnpūšļa, aknu, vairogdziedzera un krūšu) ar vismaz 11 FFPE paraugiem (kas pārstāv katru audu tipu). Virsnieru audos bija metastāzes no barības vada, plaušu, resnās zarnas audzējiem. Pārējiem audiem bija primārie audzēji. Šajā pētījumā tika izmantota reprezentatīvā analīze, lai meklētu 26 gēnus, kas aptver 21 577 bāzes 17 dažādās hromosomās. Kopā seši dažādi gēni (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* un *BRAF*) tika Sangera sekvencēti ar katru audzēju, 1–3 Sangera sekvencēti gēni, pamatojoties uz paredzamo somatisko mutāciju izplatību šajā audzējā. Sangera sekvencēšanas rezultāti identificēja 39 SNV somatiskās mutācijas 33 no 109 FFPE paraugiem. Iekārta MiSeqDx identificēja 36 SNV somatiskās mutācijas 32 no 109 FFPE paraugiem ar vienu nepatiesi negatīvu un diviem variantu pozīcijas nenoteikšanas gadījumiem. PPA bija 97,3 %. MiSeqDx identificēja 78 975 atsauces bāzes 109 FFPE paraugos ar 29 nepatiesi pozitīviem rezultātiem attiecībā uz Sangera sekvencēšanu un 3416 nenoteikšanas gadījumiem. NPA bija 99,9 %. Divu bāzu dzēsumi bija saskaņoti starp abām metodēm. [Tabula 16](#) apkopo rezultātus pēc audu veidiem.

Tabula 16 Pozitīvā un negatīvā procentuālā atbilstība pēc audu veida

Audu tips	Paragu skaits	Kopējais variantu skaits	Kopējais TP variantu skaits	Kopējais FN variantu skaits	Kopējais TN noteikšanu skaits	Kopējais FP noteikšanu skaits	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	PPA	NPA
Vīrsnieres	16	6	4	1	11 823	2	607	80	>99,9
Urīnpūslis	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Krūtis	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Resnā zarna	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Aknas	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Olnīcas	13	7	7	0	10 581	1	724	100	>99,99
Aizkuņģa dziedzeris	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Vairogdziedzis	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Kopā	109	39	36	1	78 975	29	3416	97,3	>99,9

## Reproducējamība

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu MiSeqDx iekārtas reproducējamību, izmantojot DNS, kas iegūta no FFPE paraugiem. 1. pētījumā izmantoti vairāki instrumenti. 2. pētījums notika vairākās vietās.

### 1. pētījums

Iekārtas MiSeqDx reproducējamība tika noteikta, izmantojot divus iekārtas un divus apmācītus operatorus kopumā astoņās izpildēs. Reprezentatīvās analīzes, amplikona genoma konteksts, paraugi un atsauces metode ir tie paši, kas iepriekš aprakstīti par 1. pētījuma precizitāti. Rezultāti parādīti katrai iekārtai uz amplikona bāzes ([Tabula 17](#)), lai demonstrētu noteikšanas reproducējamību starp iekārtām. Pareizo noteikšanas gadījumu procentuālais daudzums ietvēra gan nepareizas noteikšanas, gan nenoteikšanas gadījumus (variantu noteikšanai nav sasniegti viena vai vairāku filtru izpildes nosacījumi). Instrumenti ģenerēja līdzīgu beznoteikšanas gadījumu skaitu atkarībā no konkrētā amplikona. MiSeqDx 1 tika novērots viens kļūdainas noteikšanas gadījums uzticama reģiona ietvaros, kā noteikts atsauces standartā Platinum Genomes. Kļūdainās noteikšanas gadījums bija nepatiesi pozitīva ievietošanas varianta noteikšana 64. amplikonā, meklējot 10. hromosomu pozīcijās no 55 892 599 līdz 55 892 687. Amplikonam bija dinukleotīdu atkārtotības no 11.



Tabula 17 Reproducējamības pētījuma starp iekārtām rezultāti MiSeqDx iekārtai (amplikonu līmenī)

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
1	1	93	93	Indels	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indels	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indels	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indels	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indels	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Nav	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Nav	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
17	3	93	93	AT(3), indels	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Nav	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indels	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indels	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Nav	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Nav	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Nav	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
34	5	75	75	Indels	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indels	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indels	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indels	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Nav	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indels	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indels	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Nav	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indels	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Nav	0,42	4980	0	0	4980	0	0

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indels	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indels	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Nav	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indels	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indels	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Nav	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Nav	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Nav	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indels	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Nav	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indels	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Nav	0,59	6120	0	0	6118	0	2

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Nav	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indels	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	PolyA (5), CA(3), indels	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Nav	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Nav	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indels	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indels	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Nav	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
90	14	81	81	Indels	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indels	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indels	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indels	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indels	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Nav	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indels	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Nav	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indels	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indels	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
111	17	84	82	PolyA (13), indels (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indels	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Nav	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indels	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indels	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Nav	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Nav	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Nav	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Nav	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Nav	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0

Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indels	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indels	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indels	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indels	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indels	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indels	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indels	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Nav	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indels	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Nav	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indels	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Nav	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Nav	0,55	0	0	0	0	0	0



Amplikons	Hromosoma	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits	Pareizas noteikšanas gadījumi kopā	Nepareizas noteikšanas gadījumi kopā	Kopējais beznoteikšanas gadījumu skaits
149	Y	91	0	Nav	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Reproducējamības pētījuma rezultāti tika analizēti par katru operatoru, izmantojot variantu biežumu (Tabula 18). Šīs analīzes parādīja, ka atšķirīgs biežums starp operatoriem bija pastāvīgs. Tiek parādīts vidējais atšķirību biežums +/- 1 standartnovirze.

Tabula 18 MiSeqDx instrumenta rezultāti starp operatoriem

Atšķirīgs biežuma diapazons	Unikālo variantu skaits	1. operatora analizēto variantu skaits	2. operatora analizēto variantu skaits	1. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums	2. operatora vidējais (SD) ziņotais atšķirīgais biežums
Augsts biežums (~ 100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Vidējs biežums (~ 50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Mazs biežums (3–7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Katra parauga reproducējamības pētījumu rezultāti ir parādīti, apvienojot tos no visām astoņām izpildēm (Tabula 19). Atklāšana tiek vērtēta atsevišķi katram variantu tipam — SNV, ievietojumi un dzēsumi atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas. Šī analīze parādīja, ka variantu rezultāti bija reproducējami paraugos.

Tabula 19 MiSeqDx iekārtas bāzu noteikšanas rezultātu atbilstība katrā paraugā

Paraugs	SNV				Insercijas				Delēcijas			
	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits	Kopējais skaits	Kopējais TP skaits	Kopējais FP skaits	Kopējais FN skaits
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup>Variants ar frekvenci, kas lielāka par 20 %.

<sup>2</sup>Variants ar frekvenci, kas mazāka par 20 %.

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

- GC saturs  $\geq 19$  % (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvenčētiem amplikoniem ar 19 % GC saturu, ar pareizu noteikšanas gadījumu un bez noteikšanas gadījumu biežumu 3,4 %)
- GC saturs  $\leq 73$  % (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvenčētiem amplikoniem ar 73 % GC saturu, ar pareizu noteikšanas gadījumu un bez noteikšanas gadījumu biežumu 0,1 %)
- PolyA garums  $\leq 8$  (8 nukleotīdu PolyA atkātojums tika pareizi noteikts 120 no 120 sekvenčētiem amplikoniem, kas satur PolyA = 8)

- PolyT garums  $\leq 10$  (10 nukleotīdu PolyT atkārtojums tika pareizi noteikts 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyT = 10)
- PolyG garums  $\leq 6$  (6 nukleotīdu PolyG atkārtojums tika pareizi noteikts 720 no 720 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyG = 6)
- PolyC garums  $\leq 6$  (PolyC atkārtojums no 6 nukleotīdiem tika pareizi noteikts 359 no 360 sekvencētiem amplikoniem, kas satur PolyC = 6, un 1 bez noteikšanas)
- Dinukleotīdu atkārtotā garums ir  $\leq 4x$  (visas noteiktās bāzes 600 no 600 sekvencētiem amplikoniem ar 4x dinukleotīdu atkārtojumiem tika noteiktas pareizi ar beznoteikšanas biežumu 0,4 %)
- Trinukleotīdu atkārtotā garums ir  $\leq 5x$  (visas noteiktās bāzes 120 no 120 sekvencētiem amplikoniem ar 5x trinukleotīdu atkārtojumu pareizi noteiktas ar 1,9 % beznoteikšanas biežumu)
- 24 vai mazāk bāzes ievietošanu un 25 vai mazāk bāzes dzēšanu
  - 24 bāzes ievietošanu tika pareizi noteikti 120 no 120 paraugiem
  - 25 bāzes dzēšanu pareizi noteica 182 paraugos un ziņoja par neesošiem noteikšanas gadījumiem 2 paraugos no 184 paraugiem

## 2. pētījums

Tika veikts ārējs pētījums, lai novērtētu reprezentatīvās divu gēnu analīzes reproducējamību, kas aprakstīts 2. precizitātes pētījumā, trīs ārējās testēšanas vietās (divi operatori katrā vietā), vienā reaģentu partijā un trīs secīgās testēšanas dienās. Pārbaude tika veikta ar sešiem labi raksturotiem genomu DNS paraugu paneļiem no FFPE klīniskajiem eksemplāriem vai šūnu līnijām. Katrs panelis sastāv no 10 elementiem, 60 elementu visos paneļos kopā.

60 paneļa elementi sastāv no četriem unikālu savvaļas tipa (paredzēti paneļa mutācijām) eksemplāru dublikātiem, 12 unikāliem mutāciju eksemplāriem (ar vienu mutāciju), kas sagatavoti gan augstā, gan zemā mutāciju biežuma līmenī, un divi unikāli mutāciju eksemplāri (ar vienu mutāciju), kas sagatavoti tikai zemā mutāciju biežuma līmenī. Katram unikālajam eksemplāra / parauga biežuma līmeņa paraugam (testēts divos eksemplāros katrā piegājenā) bija 36 iespējamie rezultāti (2 replikāti  $\times$  2 operatori  $\times$  3 dienas  $\times$  3 vietas), ja visi rezultāti bija derīgi.

Paredzamā procentuālā noteikšana (PEC) visos pozitīvajos un negatīvajos variantos tika izvērtēta, salīdzinot katra parauga reprezentatīvās analīzes rezultātu ar sagaidāmo mutācijas rezultātu (konstatēta vai nav konstatēta paredzētā mutācija). PEC tiek aprēķināta kā 100 % reizināts ar paredzamo noteikšanas reižu skaitu un dalīts ar noteikšanas mēģinājumu skaitu. Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

Kombinējot vietas, paraugu atbilstības koeficients bija  $\geq 94,7$  % pirmajā parauga testēšanas piegājienu vai, testējot paraugos piegājienu, kas bija derīgi pirmajā caurlaides reizē. Mutācijas līmenis PEC visos mutāciju paraugos bija 99,6 % (905/909) (95 % CI; 98,9, 99,8). Noteikšanas mēģinājumu skaits visās 56 paneļa mutācijās (neatkarīgi no tā, vai konstatētā mutācija bija paredzama vai nē) visiem derīgajiem paraugiem bija 58 856 (56 × 1051). No šiem 58 856 mutāciju līmeņa novērojumiem tikai sešos gadījumos novērotie un sagaidāmie rezultāti bija nesaskanīgi. Mutācijas līmeņa PEC visos pozitīvajos un negatīvajos variantos no visiem mutāciju un savvaļas tipa paneļa daļībniekiem kopā bija 99,99 % (58 850/58 856).

## Analītiskā jutība (tukšā robeža (LoB) un noteikšanas robeža (LoD))

Šis pētījums pārbaudīja pārbaudes robežvērtību un ar reprezentatīvu paneli noteica MiSeqDx noteikšanas robežu (LoD). Īsumā — labi raksturotās platīna genoma šūnu līnijas GM12878 un GM12877 tika formalinā fiksētas un iestrādātas parafinā, un pēc tam DNS tika ekstrahēts. Šūnu līnija GM12878 tika atšķaidīta ar GM12877 tā, lai septiņdesmit variantu (52 SNV, deviņu ievietošanu un deviņu dzēsumu) variantu frekvences būtu tuvu 0,05. Divus DNS paraugus pārbaudīja divi operatori, izmantojot divus instrumentus un divas reaģentu partijas, kopumā 10 MiSeqDx sekvencēšanas izpildēs. Rezultātā tika iegūti 40 replikāti katram variantam GM12878 un 60 replikāti katrai atbilstošajai savvaļas tipa koordinātai GM12877 katrā reaģentu partijā. LoB un LoD tika aprēķināti, izmantojot klasisko pieeju, kas norādīta CLSI EP17-A2, izmantojot neparametrisko iespēju. LoB un LoD tika aprēķināti SNV, insercijām un delēcijām atsevišķi, apvienojot variantu frekvences dotajam varianta tipam. I tipa kļūda tika definēta kā 0,01, bet II tipa kļūda tika definēta kā 0,05. LoB gadījumā apvienoto variantu frekvences tika sakārtotas no zemākās līdz augstākajai, un tika aprēķināta 99. pozīcija katrai reaģenta partijai katram variantu tipam [Tabula 20](#). MiSeqDx programmatūra izmanto robežvērtību (efektīvo LoB) 0,026 varianta frekvencē, lai noteiktu variantu kvalitatīvu noteikšanu. Aprēķinātās tukšās robežas apliecināja, ka šī robežvērtība rada I tipa kļūdu ne vairāk kā 0,01.

Tabula 20 Tukšā robeža

Varianta tips	Kopējais variantu frekvenču skaits	LoB reaģenta 1. partija (%)	LoB reaģenta 2. partija (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Insercija	540	0,79	0,60
Delēcija	540	0,96	0,84

Attiecībā uz noteikšanas līmeni tika aprēķināts katras reaģenta partijas individuālās mutācijas biežums procentos katram variantu tipam, kas ir zemāks par robežvērtību 0,026 ([Tabula 21](#)). Tā kā procenti bija mazāki par II tipa kļūdu 5 % (0,05), kombinēto variantu frekvenču vidējo vērtību aprēķināja kā noteikšanas līmeni ([Tabula 21](#)). Katra varianta veida noteikšanas līmenis tika pieņemts kā lielākais no abām vērtībām, kas aprēķinātas abām reaģentu partijām — 5,45 % SNV, 4,88 % ievietojumiem un 5,44 % delēcijām.

Tabula 21 Noteikšanas robeža

Reaģentu partija	Varianta tips	Kopējais variantu frekvenču skaits	VF mērījumu skaits < 2,6 %	VF mērījumu procentuālā daļa < 2,6 %	Noteikšanas robeža (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Insercija	360	0	0,00	4,86
	Delēcija	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insercija	360	0	0,00	4,88
	Delēcija	360	0	0,00	5,24

Tālākie pētījumi parāda MiSeqDx veikspējas raksturlielumus, izmantojot citu reprezentatīvu testu, kura mērķis ir 56 mutācijas divos klīniski nozīmīgos vēža gēnos (mutāciju panelis). Mutāciju panelis ir paredzēts, lai īpaši noteiktu 56 mutācijas divos klīniski nozīmīgos vēža gēnos (1. gēns un 2. gēns). Pārbaude vienlaikus nosaka katras no 56 mutācijām esamību vai neesamību katrā sekvencētajā paraugā. Atsauces metode šiem pētījumiem bija divvirzienu Sangerā sekvencēšana.

## Precizitāte no partijas līdz partijai

Tika veikts partijas līdz partijai precizitātes pētījums, lai novērtētu MiSeqDx instrumenta veikspēju ražoto reaģentu komplektu partijās (kas sastāv no paraugu kvalifikācijas, bibliotēkas sagatavošanas un reaģentu secības noteikšanas), izmantojot divu gēnu reprezentatīvo analīzi, izmantojot piecu sajauktu FFPE eksemplāru savienošanas paneļa paraugu kvalifikācijas prasības. Katrā FFPE eksemplārā bija divas unikālas mutācijas: viena ar zemāku (aptuveni 8 %) mutāciju biežuma līmeni, un otra ar augstu (aptuveni 14 %) mutāciju biežuma līmeni. Katram no piecu eksemplāru maisījumiem divpadsmit (12) novērojumi tika savākti trīs dienu laikā pēc kārtas ar trīs reaģentu komplekta partijām. Kopējais pētījuma novērojumu skaits visās reaģentu partijās bija 180 novērojumi visos eksemplāru maisījumos un 360 novērojumi visos mutāciju biežuma līmeņos. Visās partijās un dienās 99,7 % (359/360) novērojumu tika parādīts gaidāmais mutācijas rezultāts. Vienu zemas frekvences mutāciju nepareizi nosauca par savvaļas tipu. Katrai mutācijai / mutācijas biežuma līmenim tika veikta dispersijas komponenta analīze, lai novērtētu sistēmas mainīgumu. Kopējā standartnovirze bija no 0,011 līdz 0,029. Reaģentu partijas sastāvdaļa no kopējās standartnovirzes svārstījās no 0 līdz 0,015.

## Pārskatījumu vēsture

Dokuments Nr.	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments nr. 200006218 v02	2023. gada oktobris	Atjauninātas atsauces uz Local Run Manager 4. versijai. Atjaunināts marķējums, lai pievienotu Austrālijas sponsora informāciju. Novērsta lietošanas pamācības neatbilstības MiSeqDx iekārtas verifikācijas pētījuma ziņojumam.
Dokuments nr. 200006218 v01	2022. gada maijs	Pievienota MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro lietošanas pamācība CN par nodrošināto aprīkojumu un materiāliem, kas nav nepieciešami. Veiktspējas raksturlielumiem pievienota testēšanas informācija par MiSeqDx reaģentu komplektu v3 Micro. Brīdinājumu un piesardzības pasākumu sadaļā ir noņemta ASV specifiskā piesardzības piezīme.
Dokuments nr. 200006218 v00	2021. gada novembris	Sākotnējais laidieni, lai atbalstītu MOS v4.0 un Local Run Manager v3.0.

## Patenti un preču zīmes

Īpašumtiesības uz šo dokumentu un tā saturu pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem („Illumina”), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā raksturotā produkta(-u) lietošanu, un ne citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās personas tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit raksturotā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šā produkta(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šā dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2023 Illumina, Inc. Visas tiesības aizsargātas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo ģiņnieku ģiņšums. Deatlizētu preču zīmju informāciju skatiet vietnē [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformācija



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, ASV  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



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

### Sponsors Austrālijā

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

## Produktu marķēšana

Pilnīgu atsauci uz simboliem, kas parādās uz produkta iepakojuma un marķējuma, savam komplektam skatiet simbolu atslēgā vietnes [support.illumina.com](http://support.illumina.com) cilnē *Dokumentācija*.