

Prospect pentru instrumente cu MOS v4

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO. NUMAI PENTRU EXPORT.

Utilizarea preconizată

Instrumentul MiSeqDx este destinat secvențierii țintite a bibliotecilor de ADN din ADN genomic uman extras din sânge integral periferic sau țesut fixat în formol și încorporat în parafină (FFPE), atunci când este utilizat împreună cu analize de diagnostic *in vitro* (IVD) efectuate pe instrument. Instrumentul MiSeqDx nu este destinat secvențierii întregului genom sau *de novo*. Instrumentul MiSeqDx trebuie utilizat cu reactivi IVD înregistrați și listați, aprobați sau aprobați și cu software analitic.

Principiile procedurii

Illumina MiSeqDx este destinat redefinirii țintite a ADN-ului uman utilizând consumabile și biblioteci Illumina de secvențiere preparate din ADN genomic uman extras din sânge integral periferic sau țesut FFPE utilizând reactivi IVD înregistrați și enumerați, sau aprobați. Bibliotecile sunt pregătite prin amplificarea țintelor și adăugarea indicilor probelor și secvențelor de capturare. Bibliotecile de probe sunt capturate într-o celulă de flux și secvențiate pe instrument utilizând secvențiere prin chimie de sinteză (SBS). Chimia SBS folosește o metodă cu terminator reversibil pentru a detecta bazele mononucleotidice unice, pe măsură ce acestea sunt încorporate în catenele de ADN în creștere. Software-ul Real-Time Analysis (RTA) efectuează analiza imaginilor și definirea bazelor și atribuie un scor de calitate fiecărei baze pentru fiecare ciclu de secvențiere. Atunci când se încheie analiza principală, analiza secundară poate fi executată cu ajutorul instrumentului MiSeqDx, în vederea procesării definirilor bazelor.

Procesarea include de obicei demultiplexarea, generarea de fișiere FASTQ, alinierea, definirea variantelor și generarea de fișiere în format de definire de variantă (VCF) care conțin informații despre variantele găsite în anumite poziții într-un genom de referință. MiSeqDx folosește diferite module de analiză secundară, în funcție de fluxul de lucru.

Configurarea cu lansare dublă

Configurarea cu lansare dublă include procedurile hardware, software și de instalare pentru a permite instrumentului MiSeqDx să ruleze atât analize de diagnosticare *in vitro* (IVD), cât și teste de cercetare numai pentru utilizare în secvențiere (RUO). Configurarea cu lansare dublă permite utilizatorului să comute între modul de diagnosticare al instrumentului și modul de cercetare al instrumentului. Identificările prin radiofrecvență (RFID) de pe consumabilele de secvențiere împiedică utilizarea reactivilor de secvențiere RUO în executările de secvențiere de diagnosticare.

Limitările procedurii

- A se utiliza la diagnosticarea *in vitro*.
- Rezultatele prezentate pe etichetă au fost obținute cu panouri de analiză reprezentative, utilizând linii celulare sau de sânge integral periferic pentru performanța liniei germinale și țesut FFPE sau linii celulare FFPE pentru performanța somatică cu reactivii și modulele de software descrise. Modulele Variantă germinală și Variantă somatică au fost dezvoltate în scopul evaluării performanței cu analize reprezentative. Caracteristicile de performanță sunt furnizate în scop strict informativ. Testele de validare prezentate servesc doar la exemplificarea capacităților generale ale instrumentului și nu stabilesc capacitățile sau caracterul adecvat al instrumentului cu privire la orice revendicări specifice. Toate testele de diagnosticare dezvoltate pentru utilizarea cu acești reactivi necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță.
- Acest produs este limitat la livrarea următoarelor:
 - Leșire de secvențiere ≥ 5 Gb la lungimea de citire de 2×150 bp
 - Citește filtrul de trecere ≥ 15 milioane la o lungime de citire de 2×150 bp
 - Baze mai mari de Q30 $\geq 80\%$ la o lungime de citire de 2×150 bp.
Un procent egal cu sau mai mare de 80% dintre definițiile bazelor înregistrează scoruri de calitate pe scara Phred mai mari de 30, indicând o acuratețe a definirii bazelor mai mare de 99,9%.
- Instrumentul MiSeqDx a fost validat numai pentru a secvenția bibliotecile de ADN uman extrase din sânge integral periferic sau țesut FFPE. Bibliotecile generate din alte tipuri de probe nu trebuie utilizate cu acest instrument pentru diagnostic *in vitro*. Performanța acestui instrument pentru secvențierea acizilor nucleici microbieni sau virali din probele clinice nu a fost stabilită.
- Utilizarea preconizată a MiSeqDx este diagnosticul *in vitro* cu reactivi sau analize confirmate, aprobate sau autorizate. Limitările reactivilor și caracteristicile de performanță descrise în acest prospect se bazează pe analize reprezentative și module software. Pentru analizele IVD, consultați prospectul din ambalaj specific analizei pentru utilizarea preconizată, variantele detectate și tipul probei.
- Conținutul indel (introduceri, ștergeri și combinații ale acestora) cu o lungime mai mare de 25 bp nu este aliniat de software-ul analizei. Prin urmare, indeli cu lungimea 25 bp nu pot fi detectați de software-ul de testare.
- Sistemul a fost validat pentru detectarea variantelor mononucleotidice (SNV) și a delețiilor de până la 25 bp și a inserțiilor de 24 bp atunci când este utilizat cu software-ul modulului Variant germinativ și somatic. Pentru definire somatică, la o frecvență variantă de 0,05, au fost detectate deleții de 25 bp și inserții de 18 bp.
- Este posibil ca software-ul de testare să nu alinieze citirile de ampliconi cu conținut extrem, conducând la raportarea regiunii ca fiind de tip sălbatic. Un astfel de conținut extrem include:
 - Citiri care conțin mai mult de trei indeli
 - Citirile cu lungimi de cel puțin 30 bp cu un conținut al unei singure variante de nucleotide (SNV) 4% din lungimea totală a ampliconului țintă (excluzând regiunile sondei)

- Citirile cu lungimi < 30 bp cu un conținut SNV > 10% din lungimea totală a ampliconului (incluzând regiunile sondei).
- Variantele mari, incluzând variantele de multi-nucleotide (MNV-uri) și indelii mari, pot fi raportate sub formă de variante separate mai mici în fișierul cu rezultate VCF.
- Variantele pentru deleții pot fi filtrate sau omise atunci când se lucrează pe doi ampliconi alăturați dacă lungimea deleției este mai mare sau egală cu suprapunerea între ampliconii alăturați.
- Sistemul nu poate detecta indelii dacă aceștia sunt direct adiacenți unei amorse și nu există niciun amplicon care să se suprapună. Pentru regiunile cu ampliconi care se suprapun, testarea nu poate detecta delețiile atunci când regiunea cu suprapunere este mai mică decât mărimea deleției care urmează a fi detectată. De exemplu, dacă regiunea de suprapunere între doi ampliconi adiacenți este reprezentată de două baze, testarea nu poate detecta nicio deleție care include ambele aceste baze. O deleție doar a uneia din aceste baze poate fi detectată.
- La fel ca în cazul oricărui flux de lucru de pregătire a unei biblioteci pe bază de hibridizare, polimorfismele de context, mutațiile, inserțiile sau delețiile în regiunile de legare a oligonucleotidelor pot afecta alelele analizate și definirile efectuate în cursul secvențierii. În consecință, definirile efectuate în timpul secvențierii sunt, de asemenea, afectate. De exemplu:
 - Este posibil ca o variantă în fază cu o variantă în regiunea amorsei să nu fie amplificată, având ca rezultat o definire fals negativă.
 - Variantele din regiunea amorsei pot împiedica amplificarea alelei de referință, având ca rezultat o definire incorectă a variantei homozigote.
 - Variantele de indeli în regiunea amorsei pot cauza o definire fals pozitivă la finalizarea citirii adiacente amorsei.
- Indelii pot fi filtrați din cauza polarizării catenei dacă ei apar lângă capătul unei citiri și suferă o decupare soft în timpul alinierii.
- MNV-urile mici nu au fost validate.
- Variantele de copiere sau variantele structurale, cum ar fi fuziunile sau translocările, nu au fost validate.
- Limitări specifice pentru linia germinală:
 - Sistemul MiSeqDx, utilizând Germline Variant Module, este conceput să livreze rezultate calitative pentru definirea variantei de linie germinală (de ex. homozigotă, heterozigotă, de tip sălbatic).
 - Când se utilizează cu Germline Variant Module, acoperirea minimă per amplicon necesară pentru o definire corectă a variantei este de 150x. Numărul de probe și numărul total de baze vizate afectează acoperirea. Conținutul de GC și alt conținut genomic pot afecta acoperirea.
 - Variația numărului de copii poate afecta identificarea unei variante drept homozigotă sau heterozigotă.
 - Variantele într-un anumit context repetitiv sunt eliminate prin filtrare în fișierele VCF. Filtrul RMxN cu repetare este utilizat pentru a filtra variantele dacă întreaga secvență de variante sau o parte a acesteia este prezentă în mod repetat în genomul de referință adiacent poziției variantei. Pentru definirea variantei de linie de germeni, sunt necesare cel puțin nouă repetări în referință pentru ca o variantă să fie filtrată și sunt luate în considerare numai repetările cu lungimea de până la 5 bp (R5x9).

- Limitări specifice pentru Somatic:
 - Sistemul MiSeqDx, utilizând Somatic Variant Module, este conceput să livreze rezultate calitative pentru definirea variantei somatice (de ex., prezența unei variante somatice cu o frecvență a variantei mai mare sau egală cu 0,026, cu o limită a detecției de 0,05).
 - Când se utilizează cu Somatic Variant Module, acoperirea minimă per amplicon necesară pentru o definire corectă a variantei este de 450x per fond de oligonucleotide. Numărul de probe și numărul total de baze vizate afectează acoperirea. Conținutul de GC și alt conținut genomic pot afecta acoperirea.
 - Variantele într-un anumit context repetitiv sunt eliminate prin filtrare în fișierele VCF. Filtrul RMxN cu repetare este utilizat pentru a filtra variantele dacă întreaga secvență de variante sau o parte a acesteia este prezentă în mod repetat în genomul de referință adiacent poziției variantei. Pentru definirea variantei somatice, sunt necesare cel puțin șase repetări în referință pentru ca varianta să fie filtrată și sunt luate în considerare numai repetările cu lungimea de până la 3 bp (R3x6).
 - Somatic Variant Module nu poate face diferența între variantele de linie germinală și variantele somatice. Modulul este conceput să detecteze variante pentru o gamă de frecvențe de variante, dar frecvența variantei nu poate fi utilizată pentru a diferenția variantele somatice de variantele de linie germinală.
 - Țesutul normal din cadrul specimenului influențează detectarea variantelor. Limita raportată a detecției se bazează pe o frecvență a variantei relativ la ADN total extras atât din țesutul tumoral, cât și din cel normal.

Componentele produsului

Illumina MiSeqDx este alcătuit din următoarele:

Instrument MiSeqDx(Nr. catalog DX-410-1001)

Următoarele componente software sunt necesare pentru operarea instrumentului MiSeqDx și analiza datelor:

Aplicație software	Funcție	Descriere
MiSeq Operating Software (MOS)	Controlează funcționarea instrumentului	Aplicația software MOS gestionează operarea instrumentului în timpul secvențierii și generează imagini în scopul utilizării de către software-ul Real-Time Analysis (RTA). Pentru mai multe informații, consultați <i>Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4 (nr. document 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Efectuează analiza principală	Aplicația software RTA convertește imaginile generate de MOS pentru fiecare dală per ciclu al rulării de secvențiere în fișiere de definire de baze, care sunt date de intrare pentru modulele de analiză ale Local Run Manager. Aplicația software RTA nu conține o interfață cu utilizatorul.

Aplicație software	Funcție	Descriere
Local Run Manager	Interfața pentru selectarea modului	SoftwareLocal Run Manager-ul este o soluție integrată pe instrument pentru gestionarea utilizatorilor, executarea analizei secundare și monitorizarea stării. Pentru mai multe informații, consultați <i>Ghid software Local Run Manager v4 pentru MiSeqDx (document nr. 200046657)</i> .

Depozitare și manipulare

Element	Specificații
Temperatură	Transport și depozitare: între -10 °C și 40 °C (între 14 °F și 104 °F). Condiții de utilizare: între 19 °C și 25 °C (între 66 °F și 77 °F)
Umiditate	Transport și depozitare: umiditate fără condens Condiții de funcționare: mențineți umiditate relativă 30–75% (fără condens)

Echipamentele și materialele necesare, nefurnizate

Consumabile de secvențiere

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Nr. catalog 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Nr. catalog 20063860)

Consumabile furnizate de utilizator

Asigurați-vă că aveți la dispoziție următoarele consumabile furnizate de utilizator înainte de scanare.

Consumabil	Scop
Șervețele cu alcool, alcool izopropilic 70% sau Etanol, 70%	Curățarea sticlei și a platformei celulei de curgere
Șervețele pentru laborator, care nu lasă scame	Curățarea suportului celulei de flux.
Hârtie pentru obiectiv, 4 x 6 in.	Curățarea celulei de flux
Tween 20	Spălarea instrumentului
Pensete, plastic cu vârf pătrat (opțional)	Scoaterea celulei de flux din recipientul de expediere a celulei de flux
Apă destinată utilizării în laborator	Spălarea instrumentului

Îndrumări cu privire la apa destinată utilizării în laborator

Folosiți întotdeauna apă destinată utilizării în laborator sau apă deionizată pentru a efectua procedurile specifice instrumentului. Nu utilizați niciodată apă de la robinet.

Utilizați exclusiv tipurile de apă de mai jos sau echivalentul acestora:

- Apă deionizată
- Illumina PW1
- Apă de 18 Megaohmi (MΩ)
- Apă tratată cu sistemul Milli-Q
- Apă tratată cu sistemul Super-Q
- Apă destinată utilizării în cadrul procedurilor de biologie moleculară

Avertizări și precauții



AVERTIZARE

Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Ventilația trebuie să fie adecvată pentru manipularea materialelor periculoase în reactivi. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișierele SDS la adresa support.illumina.com/sds.html.

- Manipulați toate probele de sânge ca și cum se știe că sunt infecțioase cu virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul hepatitei B (HBV) și alți agenți patogeni transmisibili prin sânge (precauții universale).
- Nerespectarea procedurilor menționate poate duce la rezultate greșite sau la reducerea semnificativă a calității probelor.
- Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați probe și reactivi din seturi. După ce manipulați probe și reactivi din seturi, spălați-vă temeinic pe mâini.
- Este necesară respectarea practicilor de laborator corespunzătoare și a igienei în laborator corespunzătoare pentru a împiedica produsele PCR să contamineze reactivii, instrumentarul și probele de ADN genomic. Contaminarea PCR poate cauza rezultate lipsite de precizie și de fiabilitate.
- Pentru a preveni contaminarea, asigurați-vă că zonele de pre-amplificare și post-amplificare dispun de echipamente și consumabile dedicate (de ex., pipete, vârfuri de pipetă, blocuri de încălzire, agitatoare prin vortexare și centrifuge).

- Acolo unde este cazul, asocierea probei index trebuie să corespundă exact cu dispunerea plăcii imprimate. populează Local Run Manager automat amorsele index asociate cu numele probelor, atunci când sunt introduse în modul. Recomandăm ca utilizatorul să verifice primerii de indexare asociați cu probele înainte de a iniția ciclul de secvențiere. Nepotrivirile între probă și configurația plăcii duc la pierderea identificării pozitive a probei și la raportarea de rezultate incorecte.
- Se recomandă ferm instalarea unui software antivirus furnizat de utilizator, pentru a proteja computerul împotriva virusilor. Consultați manualul de utilizare pentru instrucțiuni privind instalarea.
- Nu utilizați MiSeqDx dacă oricare dintre panourile acestuia este îndepărtat. Utilizarea instrumentului cu îndepărtarea oricăruia dintre panouri conduce la expunerea potențială la tensiunea de linie și la tensiunile de curent continuu.
- Nu atingeți platforma celulei de flux din compartimentul celulei de flux. Încălzitorul din acest compartiment funcționează la o temperatură între 22 °C și 95 °C și poate provoca arsuri.
- Instrumentul cântărește aproximativ 126 lbs. și poate cauza vătămări grave dacă este scăpat pe jos sau manipulat greșit.
- Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și/sau pacientul.

Instrucțiuni de utilizare

Următoarele instrucțiuni de utilizare ale instrumentului MiSeqDx necesită reactivi furnizați în MiSeqDx Reagent Kit v3.

Creare rulare cu Local Run Manager

Pentru instrucțiuni detaliate privind crearea unei rulări, consultați *Ghid software Local Run Manager v4 pentru MiSeqDx (document nr. 200046657)* și ghidul modulului Local Run Manager pentru modulul de analiză pe care îl utilizați.

Pregătirea cartușului cu reactivi

Următoarele instrucțiuni descriu modul de dezghețare a reactivilor folosind o baie de apă la temperatura camerei.

1. Scoateți cartușul cu reactivi de la depozitarea la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
2. Puneți cartușul reactivului într-o baie de apă care conține suficientă apă deionizată la temperatura camerei pentru a scufunda baza cartușului reactivului până la linia de apă imprimată pe cartușul reactivului. Nu lăsați apa să depășească limita maximă de apă.

Figura 1 Linie maximă de apă



3. Lăsați cartușul reactivului să se dezghețe în baia de apă la temperatura camerei timp de aproximativ 60-90 de minute sau până când este complet dezghețat.
4. Scoateți cartușul din baia de apă și loviți-l ușor de banc pentru a disloca apa de la baza cartușului. Uscați baza cartușului. Asigurați-vă că nu s-a stropit apă în partea superioară a cartușului reactivului.

Inspectarea cartușului de reactiv

1. Răsturnați cartușul de zece ori pentru a amesteca reactivii dezghețați și apoi verificați dacă toate pozițiile sunt dezghețate.
2. Inspectați reactivii din pozițiile 1, 2 și 4 pentru a vă asigura că sunt complet amestecați și fără precipitate.

NOTĂ Este esențial ca reactivii din cartuș să fie dezghețați și amestecați bine pentru a asigura o secvențiere corespunzătoare.

3. Loviți ușor partea inferioară a cartușului pentru a reduce bulele de aer.

NOTĂ Tuburile de aspirație MiSeqDx intră în partea de jos a fiecărui rezervor pentru a aspira reactivii, astfel încât este important ca rezervoarele să nu conțină bule de aer.

4. Puneți cartușul reactivului pe gheață sau puneți-l deoparte la 2 °C până la 8 °C (până la șase ore) până când este pregătit pentru configurarea rulării. Pentru cele mai bune rezultate, treceți direct la încărcarea probei și la configurarea rulării.

Pregătirea probelor pentru secvențiere

Pentru indicații privind pregătirea bibliotecilor de probe pentru secvențiere, inclusiv diluarea și cumularea bibliotecilor, consultați secțiunea Instrucțiuni de utilizare din prospectul din ambalajul de pregătire a bibliotecii.

Diluarea bibliotecilor de probe depinde de complexitatea fondurilor de oligonucleotide. Este necesară optimizarea densității clusterului pe MiSeqDx, iar densitatea optimă a clusterului variază în funcție de analiza specifică de pregătire a bibliotecii.

Încărcarea bibliotecilor de probe pe cartuș

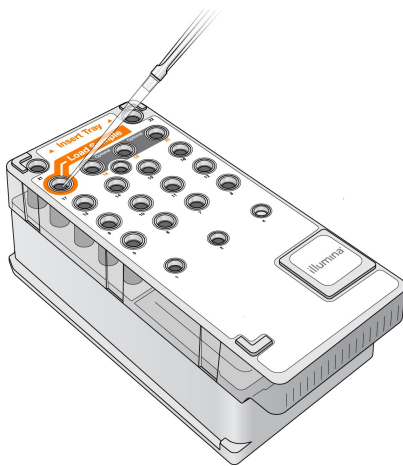
Când cartușul reactivului este complet dezghețat și gata de utilizare, sunteți gata să încărcați probele în cartuș.

1. Utilizați un vârf de pipetă separat, curat și gol de 1 ml pentru a perfora sigiliul lamei peste rezervorul de pe cartușul de reactiv etichetat **Load Samples** (încărcare probe).

NOTĂ Nu perforați nicio altă poziție a reactivului. Alte poziții ale reactivului sunt perforate automat în timpul rulării.

2. Pipetați 600 µl de biblioteci de probe din biblioteca de ampliconi diluați (DAL) preparate în rezervorul **Load Samples** (încărcare probe). Evitați atingerea foliei de etanșare.
3. Verificați dacă există bule de aer în rezervor după încărcarea probei. Dacă sunt prezente bule de aer, loviți ușor cartușul de banc pentru a elibera bulele.

Figura 2 Încărcarea bibliotecilor



4. Continuați direct cu pașii de configurare a rulării utilizând MiSeq Operating Software (MOS) interfața.

Configurarea ciclului

Consultați *Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4 (nr. document 200010452)* pentru instrucțiuni complete de configurare a rulării.

1. Conectați-vă la MiSeqDx cu parola dvs. de Local Run Manager software.
2. Din ecranul de întâmpinare al software-ului MOS, selectați **Sequence** (Secvențiere).
3. Selectați o rulare din listă, apoi selectați **Next** (Înainte).
Se deschide o serie de ecrane de configurare a rulării în următoarea ordine: Încărcarea celulei de flux, încărcarea reactivilor, revizuirea și verificarea înaintea rulării.
4. Atunci când apare ecranul Load Flow Cell (Încărcare celulă de flux), curățați și apoi încărcați celula de flux.
5. Închideți clapeta celulei de flux și ușa compartimentului celulei de flux.
Atât încuietoearea, cât și ușa compartimentului trebuie închise înainte de începerea rulării. Când celula de flux este încărcată, software-ul citește și înregistrează RFID. O confirmare că RFID a fost citită cu succes apare în colțul din dreapta jos al ecranului.

6. Urmați instrucțiunile software-ului pentru a încărca flaconul cu soluție MiSeqDx SBS (PR2), asigurați-vă că sticla cu reziduuri este goală și încărcați cartușul reactivului.
Atunci când flaconul cu soluție MiSeqDx SBS (PR2) și cartușul reactivului sunt încărcate, software-ul citește și înregistrează RFID. O confirmare că RFID a fost citită cu succes apare în colțul din dreapta jos al ecranului.
7. Când rularea începe, apare ecranul Sequencing (Secvențiere). Acest ecran oferă o reprezentare vizuală a rulării în curs, incluzând intensitățile și scorurile de calitate (Q-scores).

Rezultate

Real-Time Analysis (RTA) este un software integrat care efectuează analiza imaginilor și definirea bazelor și atribuie un scor de calitate fiecărei baze pentru fiecare ciclu de secvențiere. La finalizarea analizei primare, modulul de pe instrumentul MiSeqDx selectat în [Creare rulare cu Local Run Manager la pagina 7](#) începe analiza secundară. Consultați documentația specifică analizei pentru alte fluxuri de lucru.

Procedurile de control al calității

Software-ul MiSeqDx evaluează fiecare rulare, probă și definire de baze în funcție de valorile de control al calității. Atunci când este necesar, controalele pozitive și negative incluse în pregătirea bibliotecii trebuie, de asemenea, evaluate pentru rezultatele așteptate.

Caracteristici de performanță

Toate studiile au fost efectuate pe MiSeqDx.

Studiile cu germeni au utilizat fie analiza MiSeqDx cu 139-Variant, fie reactivii TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pentru pregătirea bibliotecii. Cele două truse utilizează reactivi identici de pregătire a bibliotecii și au o singură diferență de flux de lucru: numărul de cicluri de reacție în lanț a polimerazei (PCR) (25 și, respectiv, 28). Ciclurile PCR suplimentare permit o intrare mai mică a ADN-ului cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) în raport cu analiza MiSeqDx pentru fibroza chistică cu 139-Varianta (250 ng) demonstrat în studiul de introducere a ADN-ului utilizând TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Bibliotecile preparate cu analiza MiSeqDx cu 139-Variant au fost secvențiate cu reactivii de secvențiere din trusă. Bibliotecile pregătite cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx au fost secvențiate cu MiSeqDx Reagent Kit v3. Ultimii reactivi de secvențiere au o ieșire crescută comparativ cu cei din testul MiSeqDx cu variație de 139 de variante.

Testarea cuprinde intervalele de randament ale probei acceptate de MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx poate accepta 1–96 probe/rulare, în funcție de analiză. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro este conceput pentru a accepta debite mai mici de probă în acest interval pentru analizele selectate.

Studiile somatice au utilizat TruSeq Custom Amplicon Kit Dx cu MiSeqDx Reagent Kit v3.

Fluxurile de lucru germinale sau somatice, descrise pentru TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pentru pregătirea bibliotecilor pentru secvențiere, au fost urmate de analiza folosind modulul variantei germinale sau, respectiv, modulul variantei somatice, cu două excepții. Studii care au utilizat o genă (performanță la nivelul liniei germinale; analiză MiSeqDx cu fibroză chistică 139-Variant) sau două gene (performanță somatică) ca grupuri de mutații reprezentative au utilizat fluxuri de lucru și module de analiză specifice analizei.

NOTĂ Conținutul genomic al ampliconului este rezumat în raport cu firul genomic secvențiat. Pentru ampliconii concepuți împotriva catenei minus, conținutul genomului de referință este complementul invers (de exemplu, regiunile PolyA de pe catenele minus ampliconi corespund regiunilor PolyT de pe genomul de referință).

Definițiile calculelor folosite pentru caracteristicile de performanță

- Procentul de concordanță pozitivă (Positive Percent Agreement – PPA) este calculat ca proporția de loci clasificați ca variante de o metodă de referință pe care testarea o raportează corect.
 - $(\text{nr. de loci de variante raportați corect de testare}) / (\text{nr. total de loci de variante})$
Locii de variante raportați de testare care sunt concordanți cu metoda de referință sunt cu adevărat pozitivi (TP). Locii de variante raportați de testare ca definiții de referință sau ca definiții ale unor variante diferite sunt fals negativi (FN).
- Procentul de concordanță negativă (Negative Percent Agreement – NPA) este calculat ca proporția de loci clasificați ca de tip sălbatic de o metodă de referință pe care testarea o raportează corect.
 - $(\text{nr. de loci de tip sălbatic raportați corect de testare}) / (\text{nr. total de loci de tip sălbatic})$
Locii de tip sălbatic raportați de testare care sunt concordanți cu metoda de referință sunt cu adevărat negativi (TN). Locii de tip sălbatic raportați de testare sunt fals pozitivi (FP).
- Procentul de concordanță globală (OPA) este calculat ca proporția de loci raportați corect de testare față de o metodă de referință.
 - $((\text{nr. de loci de variante raportați corect de testare}) + (\text{nr. de loci de tip sălbatic raportați corect de testare})) / ((\text{nr. total de loci de variante}) + (\text{nr. total de loci de tip sălbatic}))$
- Calculele PPA, NPA și OPA nu includ absențele definirilor (locii de variante sau de referință care nu trec de unul sau mai multe filtre de calitate). Două studii nu includ în mod specific definiții în sistemul lor de măsurare „% definiții corecte”, iar această includere a niciunor definiții este notată pentru tabelele aplicabile.
- Indicele de definire autozomală este calculat ca numărul total de loci care trec de filtre împărțit la numărul total de poziții secvențiate pentru cromozomii 1-22. Cromozomii X și Y sunt excluși. Această valoare nu ia în considerare concordanța definirilor cu metoda de referință.

Pentru caracteristicile de performanță legate de factorii pre-analitici (de ex. metode de extracție sau introducerea ADN-ului), consultați prospectul pentru metoda aplicabilă de pregătire a bibliotecii.

Indexarea probelor

Amorsele indicelui probei, adăugate în timpul pregătirii bibliotecii, alocă o secvență unică fiecărei probe ADN, permițând combinarea mai multor probe într-o singură rulare de secvențiere. Indexarea probelor a fost testată atât pentru fluxurile de lucru de linie germinală, cât și pentru cele somatice.

Au fost testate în total 96 de probe indexate, prin intermediul unei testări reprezentative concepute să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze per catenă în toți cei 23 de cromozomi umani, pentru a verifica abilitatea testării de a efectua o definire de genotipare în mod consecvent pentru o probă dată în diferite combinații de amorse de indexare. Cromozomul Y nu conține regiuni de încredere și nu a fost evaluat. Au fost testate opt probe unice cu 12 combinații diferite de amorse de indexare per probă. Rezultatele probelor folosind Germline Analysis Module au fost comparate cu Platinum Genomes versiunea 2016-01. PPA (SNV-uri și indels) a depășit 97% (definirile pozitive reale au fost de cel puțin 70 pentru SNV-uri, 38 pentru inserții, 36 pentru deleții) și NPA a fost de 100% (cel puțin 23.440 de poziții de referință per combinație de indici) pentru fiecare dintre cele 96 de combinații de indici. Independent, a fost testat un singur indice pentru a verifica dacă chimia MiSeqDx Reagent Kit v3 de secvențiere poate accepta mai puțin de opt probe (chimia predecesoare din trusa universală MiSeqDx 1.0 a fost limitată la minimum opt probe). Indexul unic a avut valori PPA de 98,9% (180/182) pentru SNV, 100% (38/38) pentru inserții și 100% (46/46) pentru deleții. NPA a fost de 100% (23.856/23.856).

Au fost testate 12 replicate (24 de biblioteci) ale unei probe pentru a măsura acuratețea indicelui cu variante somatice la frecvențe de la 0,05 la 0,10 folosind modulul Variant somatic (se utilizează 2 combinații de indice per replicat pentru a efectua definiri somatice). PPA a fost 100% pentru SNV (64/64), inserții (11/11) și deleții (19/19). NPA a fost de 100% (cel puțin 11590 de poziții de referință per combinație de indici) pentru toate combinațiile de indici.

Transferul probelor

Fluxul de lucru al instrumentului MiSeqDx implică pregătirea și secvențierea bibliotecii pentru mai multe probe plus controale procesate toate simultan. Studiul privind transferul probelor a fost efectuat pentru a evalua dacă există rezultate fals pozitive, cauzate de transferul între godeuri în timpul pregătirii bibliotecii de probe sau de contaminarea între ciclurile de secvențiere consecutive, care să influențeze rezultatele testului. Au fost utilizate variante somatice, deoarece acestea pot fi detectate la evenimente cu frecvență a alelelor mai scăzută decât variantele liniei germinale.

Probele au constat din patru probe de ADN genomic din linii celulare, fiecare conținând mutații de panou diferite într-o analiză cu două gene reprezentative. Probele au fost de așa natură încât o mutație într-o poziție din una va avea o secvență de referință (tip sălbatic) în celelalte.

Transferul de la godeu la godeu este definit ca un mod de defectare potențial creat prin etapele de procesare manuală (pipetare, amestecare probe etc.). Pentru a evalua transferul de la un godeu de probe la altul, au fost efectuate două testări:

- O dispunere a tablei de verificare a unei probe de ADN genomic de intrare înaltă (gDNA) care conține o mutație la nivelul Genei 1, alternând cu o probă de gDNA de intrare joasă care conține un mutant la nivelul Genei 2.
- O dispunere a tablei de verificare a unei probe de gDNA de intrare ridicată care conține o mutație la nivelul Genei 2, alternând cu o probă de gDNA de intrare scăzută care conține o mutație la nivelul Genei 1.

În fiecare rulare, au fost evaluate în total 12 replicare pentru rezultate fals pozitive (de ex. o mutație a genei 1 raportată într-o probă mutantă a genei 2 bine desemnată ca probă mutantă a genei 2 sau viceversa).

Transferul de la o rulare la alta este definit ca un mod de eșec potențial creat de reziduuri dintr-o rulare de secvențiere anterioară. Pentru a determina dacă există transfer între ciclurile de secvențiere, două plăci care conțin fiecare 11 replicare ale unei singure probe unice de gDNA de intrare ridicată plus o probă goală au fost pregătite și secvențiate consecutiv pe un instrument MiSeqDx și evaluate pentru rezultate fals pozitive. Prima rulare a conținut 11 replicare ale unei probe mutante Gene 2 plus un blanc. A doua rulare a conținut 11 replicare ale unei probe mutante Gene 1 plus 1 blanc. Biblioteca de probe mutante Gene 2 a fost secvențiată prima dată, urmată de o rulare ulterioară de secvențiere cu biblioteca de probe mutante Gene 1, urmată de o altă rulare repetată de secvențiere a bibliotecii de probe mutante Gene 2. Dacă se observă orice mutații ale genei 2 într-o rulare numai cu mutații ale genei 1 și invers, acest lucru indică transferul.

Au fost raportate zero rezultate fals pozitive (0/24, 0%) din cauza transferului *de la un godeu la altul*. Au fost detectate toate mutațiile preconizate. Au fost raportate zero rezultate fals pozitive (0/24, 0%) din cauza transferului *de la o rulare la alta*. Au fost detectate toate mutațiile preconizate. S-au raportat zero rezultate fals pozitive (0/48, 0%) din cauza transferului *total* (de la godeu la godeu și de la o rulare la alta combinate).

Caracteristici de performanță Linie germinală

Studiile descrise aici au utilizat modulul variantei germinale pentru a analiza datele de secvențiere, cu excepția acelor studii care utilizează un panou genic unde a fost utilizat un modul specific analizei.

Acuratețe

Următorul studiu a fost efectuat pentru a evalua acuratețea instrumentului MiSeqDx cu MiSeqDx Reagent Kit v3 și ADN de înaltă calitate. Acest studiu a folosit o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți folosind 150 de ampliconi. Cromozomul Y nu conține regiuni de încredere și nu a fost evaluat. Cele 12 probe unice utilizate în acest studiu provin de la o singură familie - doi părinți și 10 copii - ordonate frecvent de mai multe laboratoare și metodologii de secvențiere. Există cinci probe de la femei și șapte de la bărbați. Fiecare dintre probe a fost testată în duplicat. Precizia a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții prin compararea datelor studiului cu o bază de date de referință bine caracterizată. Secvența bazei de date de referință (Platinum Genomes versiunea 2016-01) a fost derivată din combinația de metodologii de secvențiere multiplă, date disponibile public și informații ereditare. Regiunile genomice cu grad de încredere au fost definite pe baza acestei metode de referință, dacă nu se specifică altfel. În total, probele au fost rulate de opt ori, tabelele prezentate pentru a demonstra acuratețea se bazează pe datele de la prima rulare.

Tabelul 1 conține datele de studiu prezentate cu procentul de concordanță pozitivă și negativă per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu metoda de referință compusă, bine caracterizată pentru calculele PPA. Cele trei tipuri de variante (SNV-uri, inserții și deleții) sunt combinate. Deoarece metoda de referință furnizează rezultate doar pentru variantele mononucleotidice și inserții/deleții, rezultatele privind bazele de non-variantă sunt comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19 pentru calculele NPA.

Tabelul 1 Acord pentru rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx per probă

Probă	Indice mediu de definire	Număr total de variante	Nr. total variante TP	Nr. total variante FN	Nr. total fără definiri	Nr. total definiri TN	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100

Probă	Indice mediu de definire	Număr total de variante	Nr. total variante TP	Nr. total variante FN	Nr. total fără definiri	Nr. total definiri TN	PPA	NPA	OPA
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Testarea reprezentativă a constatat în 150 de ampliconi proiectați să acopere diverse conținuturi genomice. Conținutul GC al ampliconilor a variat între 26% și 87%. De asemenea, ampliconii au avut o gamă de repetări mononucleotidice (de ex., PolyA, PolyT), de dinucleotide și trinucleotide. Datele au fost compilate pe bază de amplicon ([Tabelul 2](#)) pentru a determina efectul conținutului genomic asupra % definirilor corecte. % din definirile corecte constă din definiri de variantă și referință și este mai mic de 100% dacă există definiri incorecte sau nu există definiri. Nu se efectuează definiri atunci când unul sau mai multe filtre nu sunt îndeplinite pentru definirea variantei (de ex. acoperire insuficientă).

Dintre cele opt variante FN din [Tabelul 2](#), șapte au avut loc cu o inserție de 1 bp pe amplicon 111 care conține și homopolimer PolyA și conținut GC de 0,29. Restul de 1 FN (definire incorectă) s-a datorat unui SNV heterozigot așteptat, pe ampliconul 125 cu un conținut GC de 0,68, numit ca variantă homozigotă. Frecvența variantei SNV a fost de 0,71, care depășește pragul de 0,70 pentru clasificare ca variantă homozigotă. Ampliconul cu cel mai mic % de definiri corecte (98,2%) a fost ampliconul 17 cu 40 de definiri fără conținut de repetiții AT și conținut GC de 27%.

Tabelul 2 Precizia la nivel de amplicon pentru instrumentul MiSeqDx

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nu se aplică	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Nu se aplică	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nu se aplică	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nu se aplică	0,29	1872	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nu se aplică	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Nu se aplică	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	Poly G (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nu se aplică	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nu se aplică	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nu se aplică	0,42	1992	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nu se aplică	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nu se aplică	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nu se aplică	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nu se aplică	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nu se aplică	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nu se aplică	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nu se aplică	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	2016	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nu se aplică	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Nu se aplică	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nu se aplică	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nu se aplică	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nu se aplică	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nu se aplică	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nu se aplică	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nu se aplică	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nu se aplică	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Nu se aplică	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nu se aplică	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nu se aplică	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nu se aplică	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nu se aplică	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	Nu se aplică
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	Nu se aplică
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nu se aplică

Variantele care nu au fost definiții sunt rezumate în [Tabelul 3](#). Filtrele specifice care au dus la lipsa definițiilor sunt listate în tabel. Introducerea pe ampliconul 111 a fost filtrată pentru nouă din 16 cazuri, cele șapte cazuri rămase fiind denumite drept referință și, prin urmare, FN.

Tabelul 3 Rezumatul variantelor fără definiții

Nr. amplicon	Chr:Pos	VARIANTĂ	Conținutul corespunzător al ampliconului	Filtru	Variante ratate	Variante preconizate	Definiții FN
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0

Nr. amplicon	Chr:Pos	VARIANTĂ	Conținutul corespunzător al ampliconului	Filtru	Variante ratate	Variante preconizate	Definiri FN
111	17:39589692	C > CA	Poly A (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Repetați filtrul. O variantă este filtrată dacă întreaga secvență de variante sau o parte a acesteia este prezentă în mod repetat în genomul de referință adiacent poziției variantei. Sunt necesare cel puțin nouă repetiții în referință și sunt luate în considerare numai repetițiile cu o lungime de până la 5 bp.

Rezultatele de secvențiere pentru proba NA12878 au fost comparate cu un genotip cu grad ridicat de încredere pentru NA12878, stabilit de Institutul național pentru standarde și tehnologie (NIST) (v.2.19). Dintre cei 150 de ampliconi, 92 de ampliconi au fost pe deplin conținuți în regiunile genomice cu grad ridicat de încredere, 41 de ampliconi au avut suprapunere parțială și 17 ampliconi nu au avut nicio suprapunere în secvența NIST. Acest rezultat a determinat 10.000 de coordonate per replicare pentru comparație. Definirile bazelor de non-variante au fost comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman 19. Rezultatele privind acuratețea sunt prezentate în [Tabelul 4](#).

Tabelul 4 Acordul privind rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx pentru proba NA12878 cu baza de date NIST

Probă	Nr. ampliconi	Indice mediu de definire	Nr. total variante TP	Nr. total variante FN	Nr. total definiri TN	Nr. total definiri FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Probele au fost analizate în continuare pentru definirea de mici inserții și deleții (indeli) ([Tabelul 5](#)). În unele cazuri, indelul a fost frecvent în rândul a două sau mai multe probe, așa cum este reflectat în coloana Nr. total al probelor se reproduce cu Indel. Rezultatele pentru ambele replicare ale celor 12 probe valide sunt incluse în [Tabelul 5](#). A existat un total de 71 de indeli, variind ca dimensiuni între 1 și 24 bp pentru inserții și între 1 și 25 bp pentru deleții. Au fost detectate câte 69 de indeli, fiecare cu o concordanță procentuală pozitivă de 100%. O deleție (amplicon 64; deleție 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) nu a avut definiri corecte deoarece fiecare dintre aceste variante a fost o definire absentă din cauza filtrului R5x9. Prin urmare, PPA, care nu exclude nicio definire, nu a putut fi calculat. O altă inserție indel, de 1 bp (chr17 39589692 C>CA pe amplicon 111), nu a avut, de asemenea, definiri corecte, deoarece nouă variante au fost definiri absente din cauza filtrului R5x9 și șapte au fost definiri FN.

Tabelul 5 Rezumatul detectării Indel cu instrumentul MiSeqDx

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probelor cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
1	1	36450544	93	Deleție 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Deleție 3 bp	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Insertie 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Deleție 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Insertie 5 bp	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Insertie 3 bp	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Insertie 7 bp	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Deleție 6 bp	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Insertie 5 bp	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Insertie 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Insertie 2 bp	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Deleție 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Insertie 9 bp	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Deleție 1 bp	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Deleție 8 b	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Insertie 11 bp	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Deleție 4 bp	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Insertie 8 bp	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Deleție 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Deleție 3 bp	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Deleție 25 bp	CTTTCACCTTCCCCTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Deleție 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Insertie 1 bp	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Deleție 4 bp	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Insertie 1 bp	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Deleție 4 bp	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Deleție 11 bp	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probelor cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
52	8	24811064	90	Deleție 1 bp	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Insertie 4 bp	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Insertie 4 bp	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Deleție 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Deleție 3 bp	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Deleție 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Deleție 2 bp	TAC>T	10	10	0	0	Nu se aplică
68	11	30177690	70	Insertie 2 bp	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Insertie 8 bp	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Deleție 8 b	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Deleție 2 bp	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Insertie 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Insertie 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Insertie 4 bp	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Deleție 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Deleție 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Insertie 4 bp	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Deleție 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Deleție 5 bp	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Deleție 6 bp	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Deleție 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Insertie 3 bp	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Insertie 4 bp	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Deleție 7 bp	ATTATTTCT>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Deleție 1 bp	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Insertie 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Insertie 4 bp	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Insertie 1 bp	C>CA	16	9	7	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probelor cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
112	17	39589739	84	Insertie 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Deleție 4 bp	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Deleție 12 bp	TTTGATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Insertie 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Insertie 3 bp	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Deleție 2 bp	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Deleție 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Insertie 5 bp	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Insertie 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Deleție 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Insertie 11 bp	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Deleție 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Deleție 5 bp	GTTGT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Insertie 6 bp	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Insertie 5 bp	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Deleție 10 bp	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Reproductibilitate

Au fost efectuate două studii pentru a evalua reproductibilitatea instrumentului MiSeqDx cu linii celulare (studiul 1 și 2) sau sânge epuizat leucocitar îmbogățit cu linii celulare (studiul 2). Studiul 1 a utilizat mai multe instrumente. Studiul 2 a avut mai multe centre.

Studiul 1

Reproductibilitatea instrumentului MiSeqDx a fost determinată folosind două instrumente, doi operatori și două loturi de reactivi, pentru un total de opt rulări. Testarea reprezentativă, probele și metoda de referință sunt aceleași cu cele descrise pentru studiul de acuratețe.

Rezultatele sunt prezentate pe bază de amplicon pentru fiecare instrument ([Tabelul 6](#)) pentru a demonstra reproductibilitatea definirii între instrumente. % de definiri corecte a inclus atât definiri incorecte, cât și definiri fără răspuns (unul sau mai multe filtre nu sunt îndeplinite pentru definirea variantelor). Instrumentele au generat numere similare fără definiri și definiri incorecte, în funcție de ampliconul respectiv.

Tabelul 6 Rezultatele studiului privind reproductibilitatea instrumentului pentru instrumentul MiSeqDx (la nivel de amplicon)

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Nu se aplică	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Nu se aplică	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiri corecte	Total definiri incorecte	Nr. total fără definiri	Total definiri corecte	Total definiri incorecte	Nr. total fără definiri
18	3	46620561	46620643	83	83	Nu se aplică	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5) Poly A (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Nu se aplică	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Nu se aplică	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Nu se aplică	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Nu se aplică	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Nu se aplică	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Nu se aplică	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Nu se aplică	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Nu se aplică	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Nu se aplică	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Nu se aplică	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Nu se aplică	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Nu se aplică	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiri corecte	Total definiri incorecte	Nr. total fără definiri	Total definiri corecte	Total definiri incorecte	Nr. total fără definiri
73	11	101347052	101347136	85	85	Nu se aplică	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Nu se aplică	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Nu se aplică	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Nu se aplică	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Nu se aplică	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Nu se aplică	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Nu se aplică	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Nu se aplică	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Nu se aplică	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Nu se aplică	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Nu se aplică	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Nu se aplică	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total fără definiți
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Nu se aplică	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Nu se aplică	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Nu se aplică	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Rezultatele studiului de reproductibilitate au fost analizate în funcție de operator, utilizând frecvența variantelor ([Tabelul 7](#)). Această analiză a demonstrat că frecvențele variantelor au fost consecvente între operatori. Sunt prezentate frecvențele medii ale variantelor +/- 1 abatere standard.

Tabelul 7 Rezultatele de la operator la operator pentru instrumentul MiSeqDx

Interval de frecvență variație	Nr. variante unice	Număr total de variante analizate Operator 1	Număr total de variante analizate Operator 2	Operator frecvență variație medie (SD) raportată 1	Operator frecvență variație medie (SD) raportată 2
homozigot (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigot (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Rezultatele studiului de reproductibilitate pentru fiecare probă sunt prezentate compuse din toate cele opt rulări ([Tabelul 8](#)). Detecția este evaluată pentru fiecare tip de variantă – SNV-uri, inserții și deleții – separat. Pozițiile de referință sunt excluse. Această analiză a demonstrat că rezultatele pentru variante au fost reproductibile în probe.

Tabelul 8 Acord pentru rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx per probă

Probă	SNV-uri				Inserții				Deleții			
	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0

Probă	SNV-uri				Insertii				Deleții			
	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN
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

Datele furnizate de cele opt rulări din acest studiu de reproductibilitate susțin afirmația că instrumentul MiSeqDx poate secvenția în mod consecvent:

- conținut GC $\geq 19\%$ (toate bazele definite în 192 din 192 ampliconi secvențiați, cu 19% conținut GC definit corect, cu o rată de absență a definirii de 1,1%)
- conținut GC $\leq 78\%$ (toate bazele definite în 192 din 192 ampliconi secvențiați, cu 78% conținut GC definit corect, cu o rată de eșec zero)
- lungimi de PolyA ≤ 8 (Repetarea PolyA de 8 nucleotide a fost definită corect în 192 din 192 de ampliconi secvențiați care conțin PolyA = 8)
- lungimi de PolyT ≤ 10 (Repetarea PolyT de 10 nucleotide a fost definită corect în 192 din 192 ampliconi secvențiați care conțin PolyT = 10)
- lungimi de PolyG ≤ 7 (Repetarea PolyG de 7 nucleotide a fost definită corect în 192 din 192 de ampliconi secvențiați care conțin PolyG = 7)
- lungimi de PolyC ≤ 6 (Repetarea PolyC de 6 nucleotide a fost definită corect în 576 din 576 de ampliconi secvențiați care conțin PolyC = 6)
- lungimi cu repetări de dinucleotide $\leq 11x$ (toate bazele definite în 192 din 192 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 11x dinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,5%)
- lungimi cu repetări de trinucleotide $\leq 5x$ (toate bazele definite în 192 din 192 ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 5x trinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,5%)
- 24 sau mai puține insertii de bază și 25 sau mai puține deleții de bază
 - insertii cu 24 de baze, definite corect în 192 din 192 de probe
 - deleții cu 25 de baze, definite corect în 223 de probe și definite greșit într-o probă din 224 de probe

Studiul 2

Un studiu de reproductibilitate de la un centru la altul efectuat cu o analiză reprezentativă, analiza variantei de fibroză chistică 139 Illumina MiSeqDx, a inclus un subset de variații genetice semnificative din punct de vedere clinic ale *CFTR* analizate cu software-ul MiSeq Reporter utilizând fluxul de lucru de secvențiere a ADN-ului vizat de platformă MiSeqDx. Studiul în regim orb a utilizat 3 centre de studiu și 2 operatori la fiecare centru. Două panouri bine caracterizate, a câte 46 de probe fiecare au fost testate de fiecare operatori de la fiecare centru, în total 810 definiri per centru. Grupurile au conținut un amestec de ADN genomic de la liniile celulare cu variante cunoscute în gena *CFTR*, precum și sânge epuizat leucocitar îmbogățit cu linii celulare cu variante cunoscute în gena *CFTR*. Probele de sânge au fost furnizate pentru a permite încorporarea pașilor de extracție utilizați pentru prepararea gDNA care servește drept intrare primară pentru fluxul de lucru al analizei. Rata de transfer a probelor, definită ca numărul de probe care au trecut de parametrii QC la prima încercare, a fost de 99,88%. Toate rezultatele testelor se bazează pe testarea inițială.

Tabelul 9 Rezumatul rezultatelor studiului de reproductibilitate efectuat cu o analiză reprezentativă a MiSeqDx pentru fibroza chistică cu 139 variante

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definirilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 ¹	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 ¹	100	100	100
A	5 ²	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 ³	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92
A	10 ³	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 ³	0	97,22	99,96	99,92

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definițiilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nu este prezent	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

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definițiilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	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	Nu se aplică	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

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definirilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
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	Nu se aplică	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	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	Nu se aplică	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	Nu se aplică	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	Nu se aplică	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

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definirilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 ⁴	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 ²	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 ²	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nu se aplică	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	100	99,96	99,96

Panou	Nr. probă	Genotip probă	Variante	Total definiri per centru	Definiri de acord pozitiv (variante)			Definiri de acord negativ (tip sălbatic)			Nr. de definiri greșite	Nr. de absențe ale definirilor	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord general (%)
					Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3	Centrul 1	Centrul 2	Centrul 3					
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	Nu se aplică	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Total				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Locația de tip sălbatic care corespunde variantei N1303K pentru un replicat a avut ca rezultat o absență a definirii din cauza acoperirii insuficiente.

² Un replicat al probelor 5 și 75 a avut o rată de definire de 0%. Investigațiile ulterioare indică faptul că este posibil ca probele să nu fi fost adăugate pe placa de probe înainte de pregătirea bibliotecii, deoarece volumele de probe rămase în eprubete au fost în concordanță cu faptul că nu a fost îndepărtat niciun volum.

³ Dovezile indică faptul că probabil probele 9 și 10 au fost schimbate de către operator înainte de pregătirea bibliotecii.

⁴ Locația de tip sălbatic corespunzând variantei M1V pentru un replicat al fiecăruia dintre cele două probe a avut ca rezultat o definire absentă din cauza acoperirii insuficiente.

Caracteristici de performanță Somatic

Studiile descrise aici au utilizat modulul Variantă somatică pentru a analiza datele de secvențiere, cu excepția acelor studii care au utilizat cele două panouri genetice în care a fost utilizat un modul specific analizei.

Acuratețe

Au fost efectuate trei studii pentru a evalua acuratețea instrumentului MiSeqDx cu ADN-ul extras din probele FFPE.

Studiul 1

Acest studiu a folosit o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți folosind 150 de ampliconi. Cromozomul Y nu conține regiuni de încredere și nu a fost evaluat. Cele cinci probe unice utilizate în acest studiu provin dintr-o singură familie – doi părinți și trei copii – ordonate frecvent de mai multe laboratoare și metodologii de secvențiere. Există trei probe de la femei și două de la bărbați. Toate probele au fost fixate cu formol și încorporate în parafină înainte de extragerea ADN-ului pentru studiu. Proba GM12877 a fost diluată, la nivel ADN, cu proba GM12878 pentru a crea GM12877-D pentru a crea un set de variante cu frecvențe de aproape 5% și 10%. Fiecare dintre probe a fost testată în duplicat, cu excepția GM12877-D, care a fost testat cu cinci replicare. Precizia a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții prin compararea datelor studiului cu o bază de date de referință bine caracterizată. Secvența bazei de date de referință (Platinum Genomes versiunea 2016-01) a fost derivată din combinația de metodologii de secvențiere multiplă, date disponibile public și informații ereditare. Regiunile genomice cu grad de încredere au fost definite pe baza acestei metode de referință, dacă nu se specifică altfel. În total, probele au fost analizate de opt ori. Tabelele prezentate pentru a demonstra acuratețea se bazează pe datele de la prima rulare.

Tabelul 10 conține datele de studiu prezentate cu procentul de concordanță pozitivă și negativă per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu metoda de referință compusă, bine caracterizată pentru calculele PPA. Cele trei tipuri de variante (SNV-uri, inserții și deleții) sunt combinate. Deoarece metoda de referință furnizează rezultate doar pentru variantele mononucleotidice și inserții/deleții, rezultatele privind bazele de non-variante sunt comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19 pentru calculele NPA.

Tabelul 10 Acordul pentru rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx cu datele de referință pentru 6 probe bine caracterizate

Probă	Indice mediu de definire	Număr total de variante	Nr. total variante TP	Nr. total variante FN	Nr. total definiri TN	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D ¹	98,4	675	650	0	57608	100	100	100
GM12877-D ²		155	155	0		100	100	100

¹ Variante cu o frecvență mai mare de 20%.

² Variantă cu o frecvență mai mică de 20%.

Cei 150 de ampliconi au fost proiectați să acopere diverse conținuturi genomice. Conținutul GC al ampliconilor a variat între 26% și 87%. Ampliconii au avut, de asemenea, un interval de repetiții de o singură nucleotidă (de exemplu PolyA, PolyT), dinucleotidă și trinucleotidă. 6 probe unice au fost utilizate în analiză. Datele au fost compilate pe bază de amplicon (**Tabelul 11**) pentru a determina efectul conținutului genomic asupra % definirilor corecte. % din definirile corecte constă din definiri de variantă și referință și este mai mic de 100% dacă există definiri incorecte sau nu există definiri. Nu se efectuează definiri atunci când unul sau mai multe filtre nu sunt îndeplinite pentru definirea variantei (de ex. acoperire insuficientă). Nu au existat definiri incorecte. Numărul de definiri absente a variat considerabil în rândul ampliconilor. Conținutul GC și mai multe interacțiuni cu conținutul GC au fost cei mai importanți factori de predicție fără definiri. 2040/2580 (79%) dintre definiri nu s-au datorat neîndeplinirii specificațiilor acoperirii. Ampliconii cu conținut GC mai mare de 78% au avut ca rezultat cele mai multe definiri. Un amplicon reprezentativ cu un conținut GC de 78% a avut în total 675 de definiri absente. Un amplicon reprezentativ cu 87% a avut un total de 1365 de definiri absente. Acoperirea poate fi crescută prin reducerea numărului de probe încărcate în celula de flux, ceea ce poate permite detectarea ampliconilor cu conținut GC ridicat.

Tabelul 11 Date privind acuratețea la nivel de amplicon

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiri corecte	Număr total de definiri incorecte	Nr. total fără definiri	% definiri corecte
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nu se aplică	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Nu se aplică	0,43	1395	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Nu se aplică	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nu se aplică	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Nu se aplică	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Nu se aplică	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	1410	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nu se aplică	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nu se aplică	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nu se aplică	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Nu se aplică	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Nu se aplică	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nu se aplică	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nu se aplică	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nu se aplică	0,65	1500	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nu se aplică	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nu se aplică	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nu se aplică	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Nu se aplică	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nu se aplică	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	1395	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nu se aplică	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nu se aplică	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nu se aplică	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nu se aplică	0,48	975	0	0	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Număr total de definiții corecte	Număr total de definiții incorecte	Nr. total fără definiții	% definiții corecte
124	19	625143	625241	99	99	Nu se aplică	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Nu se aplică	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nu se aplică	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nu se aplică	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Nu se aplică	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nu se aplică	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nu se aplică	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	Nu se aplică
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	Nu se aplică
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nu se aplică

Variantele care nu au fost definiri sunt rezumate în [Tabelul 12](#). Filtrele specifice care au dus la lipsa definirilor sunt listate în tabel.

Tabelul 12 Rezumatul variantelor fără definiri

Nr. amplicon	Chr:Pos	VARIANTĂ	Conținutul corespunzător al ampliconului	Filtru	Variante ratate	Variante preconizate
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP ¹	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61% GC	R3x6 ²	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87% GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	Poly A (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ LowDP: Acoperire scăzută. O variantă este filtrată dacă adâncimea din cel puțin unul dintre grupuri în această poziție particulară este sub 900.

² R3x6: Repetați filtrul. O variantă este filtrată dacă întreaga secvență de variante sau o parte a acesteia este prezentă în mod repetat în genomul de referință adiacent poziției variantei. Sunt necesare cel puțin șase repetări în referință și sunt luate în considerare numai repetările cu lungimea de până la 3 bp.

Rezultatele de secvențiere pentru probă au fost comparate cu un genotip cu grad ridicat de încredere pentru NA12878, stabilit de Institutul național pentru standarde și tehnologie (NIST) (v.2.19). Dintre cei 150 de ampliconi, 92 de ampliconi au fost pe deplin conținuți în regiunile genomice cu grad ridicat de încredere, 41 de ampliconi au avut suprapunere parțială și 17 ampliconi nu au avut nicio suprapunere în secvența NIST. Acest rezultat a determinat 10.000 de coordonate per replicare pentru comparație. Definirile bazelor de non-variante au fost comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19. Rezultatele privind acuratețea sunt prezentate în [Tabelul 13](#).

Tabelul 13 Acordul privind rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx cu referința NIST pentru proba GM12878

Probă	Nr. ampliconi	Indice mediu de definire	Nr. total de definiri de variante TP	Nr. total de definiri de variante FN	Nr. total definiri TN	Nr. total definiri FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Cele cinci probe au fost analizate în continuare pentru definirea de mici inserții și deleții (indeli) ([Tabelul 14](#)). În unele cazuri, indelul a fost frecvent în rândul a două sau mai multe probe, așa cum este reflectat în coloana Nr. total al probelor se reproduce cu Indel. Rezultatele pentru ambele replicare ale celor cinci probe sunt incluse în [Tabelul 14](#). A existat un total de 71 de indeli, variind ca dimensiuni între 1 și 24 bp pentru inserții și între 1 și 25 bp pentru deleții. Au fost detectate câte 68 de indeli, fiecare cu o concordanță procentuală pozitivă de 1. Trei inserții și deleții nu au avut definiri corecte, deoarece fiecare dintre aceste variante nu a fost definită din cauza filtrului R3x6. Prin urmare, PPA, care nu exclude nicio definire, nu a putut fi calculat. Cele trei variante au fost deleție 1 bp (chr8 24811064 AG>A); deleție 2 bp (chr10 55892600 TAC>T); și inserție 1 bp (chr17 39589692 C>CA).

Tabelul 14 Rezumatul detectării Indel cu instrumentul MiSeqDx

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probei cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
1	1	36450544	93	Deleție 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Deleție 3 bp	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Insertie 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Deleție 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Insertie 5 bp	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Insertie 3 bp	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Insertie 7 bp	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Deleție 6 bp	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Insertie 5 bp	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Insertie 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Insertie 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Deleție 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Insertie 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Deleție 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Deleție 8 b	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Insertie 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Deleție 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Insertie 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Deleție 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Deleție 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Deleție 25 bp	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Deleție 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Insertie 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Deleție 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Insertie 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Deleție 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Deleție 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probei cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
52	8	24811064	90	Deleție 1 bp	AG>A	15	15	0	0	Nu se aplică
53	8	76518677	67	Insertie 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Insertie 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Deleție 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Deleție 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Deleție 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Deleție 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Insertie 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Insertie 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Deleție 8 b	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Deleție 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Insertie 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Insertie 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Insertie 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Deleție 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Deleție 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Insertie 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Deleție 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Deleție 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Deleție 6 bp	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Deleție 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Insertie 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Insertie 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Deleție 7 bp	ATTATTTCT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Deleție 1 bp	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Insertie 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Insertie 4 bp	A>AACAC	7	0	0	7	100

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Poziție	Dimensiunea fragmentului analizat	Tip și lungime indel amplicon	Indel	Nr. total de reproduceri ale probei cu Indel	Nr. de definiri absente	Nr. total definiri Indel incorecte	Nr. total definiri Indel corecte	PPA
111	17	39589692	84	Insertie 1 bp	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Insertie 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Deleție 4 bp	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Deleție 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Insertie 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Insertie 3 bp	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Deleție 2 bp	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Deleție 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Insertie 5 bp	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Insertie 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Deleție 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Insertie 11 bp	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Deleție 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Deleție 5 bp	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Insertie 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Insertie 5 bp	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Deleție 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Studiul 2

Acest studiu a utilizat probe de țesut canceros colorectal FFPE depozitate într-o bancă de probe și o analiză reprezentativă a două gene, care a fost comparată cu metoda de referință, secvențierea bidirecțională Sanger (Sanger). Din cei 1183 de subiecți în total, 441 de subiecți au avut rezultate valide ale testului Sanger și ale testului reprezentativ. Când au fost evaluați la nivelul subiectului ([Tabelul 15](#)), 230 din cei 441 de subiecți au fost pozitivi de către Sanger (mutație detectată de Sanger). Dintre aceștia, 227 au fost pozitivi la testul reprezentativ. Restul de 211 din 441 de subiecți au fost negativi de către Sanger (nicio mutație detectată de Sanger). Dintre aceștia, 206 au fost negativi la testul reprezentativ. Acest lucru a dus la un acord procentual pozitiv (PPA) de 98,7% și un acord procentual negativ (NPA) de 97,6% ([Tabelul 15](#)).

Tabelul 15 Acord procentual pozitiv și negativ al rezultatelor la nivel de subiect

Analiză reprezentativă	Sanger		Total
	Pozitiv	Negativ	
Pozitiv	227 ¹	5	232
Negativ	3 ²	206	209
Total	230	211	441

Performanță Rezumat		
Acord Statistici	Estimare punct	Exact Îl 95%
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%,99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%, 99,2%]

¹Au existat 224 de potriviri exacte pentru rezultatele la nivelul tuturor subiecților, cu toate mutațiile. Pentru doi subiecți, MiSeqDx a detectat mutația Sanger și o mutație suplimentară. Pentru un subiect, MiSeqDx și Sanger au detectat mutații diferite.

²Un subiect a avut două mutații detectate de Sanger. Doi subiecți au avut o mutație detectată de Sanger.

Studiul 3

Acest studiu a evaluat bibliotecile de ADN preparate cu probe FFPE din mai multe tipuri de țesut. Un total de 109 probe FFPE din opt țesuturi diferite (colon, ovar, pancreas, suprarenal, vezică urinară, ficat, tiroidă și sân) cu cel puțin 11 probe FFPE reprezentând fiecare tip de țesut). Țesutul suprarenal a inclus metastază de la tumori esofagiene, pulmonare, de colon. Celălalt țesut a avut tumori primare. Acest studiu a folosit o testare reprezentativă concepută să interogheze 26 de gene acoperind 21.577 de baze din 17 cromozomi diferiți. Un total de șase gene diferite (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* și *BRAF*) au fost secvențiate de Sanger cu fiecare tumoră având 1-3 gene Sanger secvențiate pe baza prevalenței preconizate a mutațiilor somatice pentru acea tumoră. Rezultatele de secvențiere a sângelui au identificat 39 de mutații somatice SNV în 33 din 109 probe FFPE. Cele 36 de mutații somatice SNV MiSeqDx identificate în 32 din 109 probe FFPE cu o poziție fals negativă și două variante fără definiri. PPA a fost de 97,3%. Cele 78.975 de baze de referință MiSeqDx identificate din cele 109 probe FFPE cu 29 de rezultate fals pozitive în raport cu secvențierea Sanger și 3416 fără definiri. NPA a fost de 99,9%. O deleție a două baze a fost consecventă între cele două metode. [Tabelul 16](#) rezumă rezultatele după tipul de țesut.

Tabelul 16 Acord procentual pozitiv și negativ în funcție de tipul de țesut

Tip țesut	Nr. probe	Număr total de variante	Nr. total variante TP	Nr. total variante FN	Nr. total definiri TN	Nr. total definiri FP	Nr. total fără definiri	PPA	NPA
Suprarenală	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Vezica urinară	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Sân	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Colon	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Ficat	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Ovar	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Pancreas	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Tiroidă	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Total	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

Reproductibilitate

Au fost efectuate două studii pentru a evalua reproductibilitatea instrumentului MiSeqDx cu ADN extras din probe FFPE. Studiul 1 a utilizat mai multe instrumente. Studiul 2 a avut mai multe centre.

Studiul 1

Reproductibilitatea instrumentului MiSeqDx a fost determinată folosind două instrumente și doi operatori instruiți, pentru un total de opt rulări. Testarea reprezentativă, contextul genomic al ampliconului, probele și metoda de referință sunt aceleași cu cele descrise pentru studiul de acuratețe 1 de mai sus. Rezultatele sunt prezentate pe bază de amplicon pentru fiecare instrument ([Tabelul 17](#)) pentru a demonstra reproductibilitatea definirilor între instrumente. % de definiri corecte au inclus atât definiri incorecte, cât și definiri absente (unul sau mai multe filtre nu sunt îndeplinite pentru definirea variantelor). Instrumentele au generat numere similare fără definiri care să depindă de un anumit amplicon. Pentru MiSeqDx 1 a fost observat o singură definire incorectă într-o regiune de încredere, așa cum este definită de standardul de referință Platinum Genomes. Definirea incorectă a fost o definire fals pozitivă al unei variante de introducere în ampliconul 64 care interoga cromozomul 10 în pozițiile de la 55892599 la 55892687. Ampliconul a avut o repetare a dinucleotidei de 11.

Tabelul 17 Rezultatele studiului privind reproductibilitatea instrumentului pentru instrumentul MiSeqDx (nivel de amplicon)

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total defini- ri corecte	Total defini- ri incorecte	Nr. total defini- ri absente	Total defini- ri corecte	Total defini- ri incorecte	Nr. total defini- ri absente
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	Poly G (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	Poly T (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Nu se aplică	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	Poly A (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	Poly T (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	Poly T (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Nu se aplică	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	Poly T (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Nu se aplică	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	Poly A (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Nu se aplică	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	Poly A (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	Poly A (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	Poly A (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Nu se aplică	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	Nu se aplică	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	Poly A (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
32	5	67	67	Poly T (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	Poly G (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	Poly C (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	Poly G (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	Poly A (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Nu se aplică	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	Poly G (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
49	7	81	66	Nu se aplică	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Nu se aplică	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	Poly G (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Nu se aplică	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	Poly C (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	Poly G (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	Poly T (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Nu se aplică	0,49	4800	0	0	4800	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
66	10	81	81	Nu se aplică	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Nu se aplică	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Nu se aplică	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Nu se aplică	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	Poly A (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Nu se aplică	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	Poly G (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	Poly C (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Nu se aplică	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	Poly A (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	Poly G (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
83	13	73	73	Nu se aplică	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Nu se aplică	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	Poly T (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	Poly A (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	Poly C (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	Poly G (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	Poly T (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Nu se aplică	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
101	16	63	63	Nu se aplică	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	Poly C (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	Poly C (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	Poly T (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	Poly C (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	Poly T (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	Poly A (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	Poly A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	Poly T (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	Nu se aplică	0,37	5460	0	0	5460	0	0

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
119	18	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	Poly A (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Nu se aplică	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Nu se aplică	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Nu se aplică	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Nu se aplică	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Nu se aplică	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG (4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	Poly G (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3

Amplicon	Chromosome (Cromozom):	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente	Total definiți corecte	Total definiți incorecte	Nr. total definiți absente
136	21	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Nu se aplică	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Nu se aplică	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	Poly T (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	Poly C (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Nu se aplică	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Rezultatele studiului de reproductibilitate au fost analizate în funcție de operator, utilizând frecvența variantelor ([Tabelul 18](#)). Această analiză a demonstrat că frecvențele variantelor au fost consecvente între operatori. Sunt prezentate frecvențele medii ale variantelor +/- 1 abatere standard.

Tabelul 18 Rezultatele de la operator la operator pentru instrumentul MiSeqDx

Interval de frecvență variație	Nr. variante unice	Număr total de variante analizate Operator 1	Număr total de variante analizate Operator 2	Operator frecvență variație medie (SD) raportată 1	Operator frecvență variație medie (SD) raportată 2
Înaltă frecvență (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Frecvență medie (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Frecvență joasă (3-7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Rezultatele studiului de reproductibilitate pentru fiecare probă sunt prezentate compuse din toate cele opt rulări ([Tabelul 19](#)). Detecția este evaluată separat pentru fiecare tip de variantă – SNV-uri, inserții și deleții – separat. Pozițiile de referință sunt excluse. Această analiză a demonstrat că rezultatele pentru variante au fost reproductibile în probe.

Tabelul 19 Acord privind rezultatele definirii de bază a instrumentului MiSeqDx per probă

Probă	SNV-uri				Insertii				Deleții			
	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN	Nr. total	Nr. total TP	Nr. total FP	Nr. total FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 ¹	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 ²	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

¹Variante cu o frecvență mai mare de 20%.

²Variantă cu o frecvență mai mică de 20%.

Datele furnizate de cele 8 rulări din acest studiu de reproductibilitate susțin afirmația că instrumentul MiSeqDx poate secvenția în mod consecvent:

- conținut GC $\geq 19\%$ (toate bazele definite în 120 din 120 de ampliconi secvențiați, cu 19% conținut GC definit corect, cu o rată de absență a definirii de 3,4%)
- conținut GC $\leq 73\%$ (toate bazele definite în 120 din 120 de ampliconi secvențiați, cu 73% conținut GC definit corect, cu o rată de absență a definirii de 0,1%)
- lungimi de PolyA ≤ 8 (Repetarea PolyA de 8 nucleotide a fost definită corect în 120 din 120 de ampliconi secvențiați care conțin PolyA = 8)
- lungimi de PolyT ≤ 10 (Repetarea PolyT de 10 nucleotide a fost definită corect în 120 din 120 ampliconi secvențiați care conțin PolyT = 10)
- lungimi de PolyG ≤ 6 (Repetarea PolyG de 6 nucleotide a fost definită corect în 720 din 720 de ampliconi secvențiați care conțin PolyG = 6)

- lungimi de PolyC ≤ 6 (Repetarea PolyC de 6 nucleotide a fost definită corect în 359 din 360 de ampliconi secvențiați care conțin PolyC = 6, cu 1 absență a definirii)
- lungimi cu repetări de dinucleotide $\leq 4x$ (toate bazele definite în 600 din 600 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 4x dinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,4%)
- lungimi cu repetări de trinucleotide $\leq 5x$ (toate bazele definite în 120 din 120 ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 5x trinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 1,9%)
- 24 sau mai puține inserții de bază și 25 sau mai puține deleții de bază
 - Inserții cu 24 de baze, definite corect în 120 din 120 de probe
 - Deleții cu 25 de baze, definite corect în 182 de probe și raportate ca nedefinite în 2 probe din 184 de probe

Studiul 2

Un studiu extern a fost efectuat pentru a evalua reproductibilitatea analizei reprezentative a două gene, descrisă în studiul de acuratețe 2, în trei centre de testare externe (doi operatori per centru), un lot de reactivi și trei zile de testare neconsecutive. Testarea a fost efectuată cu șase grupuri de probe bine caracterizate din probe de ADN genomic din probe clinice FFPE sau linii celulare. Fiecare grup a constatat din 10 membri, cu un total de 60 de membri în grupuri.

Cei 60 de membri ai grupurilor au constatat din duplicate ale patru probe unice de tip sălbatic (pentru mutațiile grupului), 12 probe mutante unice (cu o singură mutație) preparate atât la niveluri de frecvență ridicate, cât și la niveluri de frecvență scăzute ale mutațiilor și două probe mutante unice (cu o singură mutație) preparate numai la un nivel de frecvență scăzut al mutațiilor. Fiecare probă unică/eșantion cu nivel de frecvență a mutațiilor (testată în duplicat în fiecare rulare) a avut 36 de rezultate posibile (2 replicare $\times$ 2 operatori $\times$ 3 zile $\times$ 3 centre) dacă toate rezultatele au fost valide.

Percent Expected Call (PEC) (Procentul de definiri preconizate) pentru toate variantele pozitive și negative a fost evaluat prin compararea rezultatului reprezentativ al testului cu rezultatul așteptat al mutației (mutație așteptată, detectată sau nedetectată) în fiecare probă. PEC este calculat ca fiind de 100% mai mare decât numărul de definiri preconizate împărțit la numărul de definiri încercate. Interval de încredere 95% bilateral se calculează folosind metoda Scorului Wilson.

Combinarea centrelor, ratele de trecere a probelor au fost $\geq 94,7\%$ pentru prima rulare a probei sau pentru probele testate în rulări care au fost valide la prima trecere. PEC la nivel de mutație în toate probele mutante a fost de 99,6% (905/909) (ÎI 95%; 98,9, 99,8). Numărul de încercări de definiri pentru toate cele 56 de mutații ale eșantionului (indiferent dacă a fost sau nu preconizată o mutație detectată)

pentru toate probele valide a fost de 58.856 (56 × 1051). Din aceste 58.856 de observații privind nivelul mutației, au existat numai șase incidente în care rezultatele observate și așteptate au fost discordante. PEC la nivel de mutație pentru toate variantele pozitive și negative de la toți membrii grupului de tip mutant și sălbatic combinați a fost de 99,99% (58.850/58.856).

Sensibilitate analitică (Limită de blanc [LoB] și Limită de detecție [LoD])

Acest studiu a verificat limita analizei și a determinat Limita de detecție (LoD) pentru MiSeqDx cu un grup reprezentativ. Pe scurt, liniile celulare de Platinum Genome GM12878 și GM12877 bine caracterizate au fost fixate cu formol și încorporate în parafină, iar apoi a fost extras ADN-ul. GM12878 a fost diluată cu GM12877 astfel încât frecvențele variantelor pentru 70 de variante (52 SNV-uri, 9 inserții și 9 deleții) au fost aproape 0,05. Cele două probe de ADN au fost testate de doi operatori, utilizând două instrumente și două loturi de reactivi, pentru un total de 10 rulări de secvențiere MiSeqDx. Acest test a avut ca rezultat 40 de replicări pentru fiecare variantă din GM12878 și 60 de replicări pentru fiecare coordonată de tip sălbatic corespunzătoare din GM12877 pentru fiecare lot de reactivi. LoB și LoD au fost calculate folosind abordarea clasică menționată în CLSI EP17-A2 bazată pe opțiunea nonparametrică. LoB și LoD au fost calculate pentru SNV-uri, inserții și deleții separat, prin cumularea frecvențelor variantelor pentru un tip de variantă dat. Eroarea de Tip I a fost definită ca 0,01 și eroarea de Tip II a fost definită ca 0,05.

Pentru LoB, frecvențele cumulate ale variantelor au fost sortate de la cele mai mici la cele mai mari și a fost calculată poziția de pe locul 99 pentru fiecare lot de reactivi pentru fiecare tip de variantă (Tabelul 20). Software-ul MiSeqDx folosește o limită (LoB efectivă) de 0,026 frecvența variantei pentru determinarea detecției calitative a variantelor. Limitele calculate de blanc au verificat că această limită are ca rezultat o eroare de tip I de maximum 0,01.

Tabelul 20 Limita de blanc

Tip de variantă	Numărul total de frecvențe ale variantelor	LoB lot de reactivi 1 (%)	LoB lot de reactivi 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Inserție	540	0,79	0,60
Deleție	540	0,96	0,84

Pentru LoD, a fost calculat procentul de frecvență a mutațiilor individuale pentru fiecare lot de reactivi pentru fiecare tip de variantă sub limita de 0,026 Tabelul 21. Deoarece procentele au fost mai mici decât eroarea de Tip II de 5% (0,05), mediana frecvențelor combinate ale variantelor a fost calculată ca LoD (Tabelul 21). Ca LoD pentru fiecare tip de variantă a fost luată drept cea mai mare dintre cele două valori calculate pentru cele două loturi de reactivi – 5,45% pentru SNV-uri, 4,88% pentru inserții și 5,44% pentru deleții.

Tabelul 21 Limita de detecție

Lot de reactivi	Tip de variantă	Numărul total de frecvențe ale variantelor	Nr. de măsurători VF < 2,6%	% din măsurători VF < 2,6%	Limita de detecție (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Insertie	360	0	0,00	4,86
	Deleție	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Insertie	360	0	0,00	4,88
	Deleție	360	0	0,00	5,24

Următoarele studii demonstrează caracteristicile de performanță ale MiSeqDx cu o altă analiză reprezentativă care vizează 56 de mutații la două gene canceroase relevante clinic (grupul de mutație). Grupul cu mutații este conceput pentru a detecta în mod specific 56 de mutații la două gene canceroase relevante clinic (Genul 1 și Genul 2). Analiza determină simultan prezența sau absența fiecăreia dintre cele 56 de mutații din fiecare probă secvențială. Metoda de referință pentru aceste studii a fost secvențierea bidirecțională Sanger.

Precizie lot la lot

S-a efectuat un studiu de precizie mult până la lot pentru a evalua performanța instrumentului MiSeqDx pe loturi de truse de reactivi fabricate (formate din reactivi de calificare a probei, de pregătire a bibliotecii și de secvențiere) utilizând analiza celor două reprezentative pentru gene, utilizând un panou de cinci probe FFPE amestecate care îndeplinesc cerințele de calificare a probei. Fiecare probă FFPE a conținut două mutații unice: una la un nivel mai scăzut (aproximativ 8%) al frecvenței mutației și una la un nivel înalt (aproximativ 14%) al frecvenței mutației. Douăsprezece (12) observații ale fiecăruia dintre cele cinci amestecuri de probe au fost colectate în trei zile neconsecutive cu trei loturi de truse de reactivi. Numărul total de observații pentru studiu în toate loturile de reactivi a fost de 180 de observații pentru toate amestecurile de probe și de 360 de observații pentru toate nivelurile de frecvență a mutațiilor. În toate loturile și zilele, 99,7% (359/360) din observații au indicat rezultatul așteptat al mutației. O mutație de joasă frecvență a fost numită incorect ca tip sălbatic. O analiză a componentelor de variație a fost efectuată pentru fiecare dintre nivelurile de frecvență a mutațiilor/mutației pentru a estima variabilitatea sistemului. Abaterea standard totală a variat între 0,011 și 0,029. Componenta lotului de reactiv a abaterii standard totale a variat între 0 și 0,015.

Istoricul versiunilor

Document nr.	Data	Descrierea modificării
Document nr. 200006218 v02	Octombrie 2023	Referințe actualizate la Managerul local de rulare pentru versiunea 4. Eticheta a fost actualizată pentru a adăuga detaliile sponsorului australian. Au fost corectate discrepanțele în cazul în care prospectul diferă de raportul studiului de verificare a Instrumentului pentru MiSeqDx.
Document nr. 200006218 v01	Mai 2022	S-a adăugat kitul de reactivi MiSeqDx v3 Micro prospect CN la echipamentele și materialele furnizate, Nu este necesar. S-au adăugat informații de testare pentru kitul de reactivi MiSeqDx v3 Micro la Caracteristici de performanță. A fost eliminată nota de atenționare specifică SUA din Avertismente și precauții.
Document nr. 200006218 v00	Noiembrie 2021	Lansare inițială pentru compatibilitate cu MOS v4.0 și Local Run Manager v3.0.

Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul acestuia constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, al mărcilor sale comerciale, al drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricăror terți prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

NERESPECTAREA OBLIGAȚIEI DE A CITI COMPLET ȘI DE A RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

© 2023 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați www.illumina.com/company/legal.html.

Informații de contact



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 S.U.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor australian

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

Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile afișate pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor la adresa support.illumina.com în fila *Documentation* (Documentație) corespunzătoare setului dvs.