

Ένθετο συσκευασίας για τα όργανα με MOS έκδ. 4

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ. ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ.

Προβλεπόμενη χρήση

Το όργανο MiSeqDx προορίζεται για στοχευμένη αλληλούχιση βιβλιοθηκών DNA από ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA που έχει εξαχθεί από περιφερικό ολικό αίμα ή μονιμοποιημένο σε φορμαλίνη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE) ιστό, όταν χρησιμοποιείται με *in vitro* διαγνωστικές (IVD) δοκιμασίες που εκτελούνται στο όργανο. Το όργανο MiSeqDx δεν προορίζεται για ολόκληρο το γονιδίωμα ή *de novo* αλληλούχιση. Το όργανο MiSeqDx προορίζεται για χρήση με εγγεγραμμένα και καταχωρισμένα, επιτρεπόμενα ή εγκεκριμένα αντιδραστήρια IVD και λογισμικό ανάλυσης.

Αρχές της διαδικασίας

Το Illumina MiSeqDx προορίζεται για στοχευμένη επαναληπτική αλληλούχιση ανθρώπινου DNA με τη χρήση αναλώσιμων αλληλούχισης της Illumina και βιβλιοθηκών που παρασκευάζονται από ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA που εξάγεται από περιφερικό ολικό αίμα ή ιστό FFPE με τη χρήση εγγεγραμμένων και καταχωρισμένων, επιτρεπόμενων ή εγκεκριμένων αντιδραστηρίων IVD. Οι βιβλιοθήκες προετοιμάζονται με την ενίσχυση των στόχων και την προσθήκη ευρετηρίων δείγματος και ακολουθιών λήψης. Οι βιβλιοθήκες δειγμάτων λαμβάνονται σε μια κυψελίδα ροής και υποβάλλονται σε αλληλούχιση στο όργανο με τη μέθοδο της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (SBS). Η χημική μέθοδος SBS χρησιμοποιεί μια μέθοδο αναστρέψιμου τερματιστή για την ανίχνευση μεμονωμένων νουκλεοτιδικών βάσεων καθώς αυτές ενσωματώνονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες DNA. Το λογισμικό Real-Time Analysis (RTA) εκτελεί ανάλυση εικόνων και αντιστοίχιση βάσης και εκχωρεί μια βαθμολογία ποιότητας σε κάθε βάση για κάθε κύκλο αλληλούχισης. Όταν ολοκληρωθεί η κύρια ανάλυση, μπορεί να εκτελεστεί δευτερεύουσα ανάλυση στο όργανο MiSeqDx για την επεξεργασία των αντιστοιχίσεων βάσης.

Η επεξεργασία συνήθως περιλαμβάνει αποπολυπλεξία, δημιουργία αρχείων FASTQ, ευθυγράμμιση, αντιστοίχιση παραλλαγών και δημιουργία αρχείων μορφής αντιστοίχισης παραλλαγών (VCF) που περιέχουν πληροφορίες σχετικά με παραλλαγές που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα γονιδίωμα αναφοράς. Ανάλογα με τη ροή εργασιών, το MiSeqDx χρησιμοποιεί διαφορετικές μονάδες δευτερεύουσας ανάλυσης.

Διαμόρφωση διπλής εκκίνησης

Η διαμόρφωση διπλής εκκίνησης περιλαμβάνει το υλικό, το λογισμικό και τις διαδικασίες εγκατάστασης που επιτρέπουν στο όργανο MiSeqDx να εκτελεί τόσο *in vitro* διαγνωστικούς (IVD) προσδιορισμούς αλληλούχισης όσο και προσδιορισμούς αλληλούχισης μόνο για ερευνητική χρήση (RUO). Η διαμόρφωση διπλής εκκίνησης επιτρέπει στον χρήστη να πραγματοποιεί εναλλαγή μεταξύ του διαγνωστικού τρόπου λειτουργίας του

οργάνου και του τρόπου λειτουργίας έρευνας του οργάνου. Τα αναγνωριστικά ραδιοσυχνοτήτων (RFID) στα αναλώσιμα αλληλούχισης αποτρέπουν τη χρήση των αντιδραστηρίων αλληλούχισης RUO σε διαγνωστικές εκτελέσεις αλληλούχισης.

Περιορισμοί της διαδικασίας

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην επισήμανση ελήφθησαν με αντιπροσωπευτικές εξετάσεις προσδιορισμού με τη χρήση περιφερικού ολικού αίματος ή κυτταρικών σειρών για την απόδοση germline και ιστού FFPE ή κυτταρικών σειρών FFPE για την απόδοση somatic με τα αντιδραστήρια και τις μονάδες λογισμικού που περιγράφονται. Οι μονάδες Germline Variant και Somatic Variant αναπτύχθηκαν με σκοπό την αξιολόγηση της απόδοσης με αντιπροσωπευτικούς προσδιορισμούς. Τα χαρακτηριστικά επιδόσεων παρέχονται μόνο για ενημερωτικούς σκοπούς. Ο έλεγχος επικύρωσης που παρουσιάζεται χρησιμεύει μόνο ως παράδειγμα των γενικών δυνατοτήτων του οργάνου και δεν καθορίζει τις δυνατότητες ή την καταλληλότητα του οργάνου σε σχέση με οποιεσδήποτε συγκεκριμένες αξιώσεις. Όλες οι διαγνωστικές εξετάσεις που έχουν αναπτυχθεί για χρήση με αυτό το όργανο απαιτούν πλήρη επικύρωση για όλες τις πτυχές απόδοσης.
- Αυτό το προϊόν περιορίζεται στην παροχή των εξής:
 - Έξοδος αλληλούχισης ≥ 5 Gb σε μήκος ανάγνωσης 2×150 bp
 - Αναγνώσεις που διέρχονται από το φίλτρο ≥ 15 εκατομμύρια σε μήκος ανάγνωσης 2×150 bp
 - Βάσεις υψηλότερες από Q30 $\geq 80\%$ σε μήκος ανάγνωσης 2×150 bp
Οι βάσεις που είναι ίσες με ή μεγαλύτερες από 80% έχουν βαθμολογίες ποιότητας Phred μεγαλύτερες από 30, γεγονός που υποδεικνύει ακρίβεια αντιστοίχισης βάσης μεγαλύτερη από 99,9%.
- Το όργανο MiSeqDx έχει επικυρωθεί μόνο για την αλληλούχιση βιβλιοθηκών ανθρώπινου DNA που εξάγονται από περιφερικό ολικό αίμα ή ιστό FFPE. Βιβλιοθήκες που παράγονται από άλλους τύπους δειγμάτων δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με αυτό το όργανο για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Η απόδοση αυτού του οργάνου για την αλληλούχιση μικροβιακών ή ιικών νουκλεϊκών οξέων από κλινικά δείγματα δεν έχει τεκμηριωθεί.
- Το MiSeqDx προορίζεται για *in vitro* διαγνωστική χρήση με εγγεγραμμένα και καταχωρισμένα, επιτρεπόμενα ή εγκεκριμένα αντιδραστήρια ή προσδιορισμούς IVD. Οι περιορισμοί αντιδραστηρίων και τα χαρακτηριστικά απόδοσης που περιγράφονται σε αυτό το ένθετο συσκευασίας βασίζονται σε αντιπροσωπευτικούς προσδιορισμούς και μονάδες λογισμικού. Για προσδιορισμούς IVD, ανατρέξτε στο ειδικό για τον προσδιορισμό ένθετο συσκευασίας για την προοριζόμενη χρήση, τις παραλλαγές που ανιχνεύτηκαν και τον τύπο δείγματος.
- Το περιεχόμενο indel (εισαγωγές, διαγραφές και συνδυασμοί αυτών) μήκους μεγαλύτερου από 25 bp δεν ευθυγραμμίζεται από το λογισμικό προσδιορισμού. Επομένως, οι περιπτώσεις indel με μήκος 25 bp δεν είναι ανιχνεύσιμες από το λογισμικό προσδιορισμού.

- Το σύστημα έχει επικυρωθεί για την ανίχνευση μονονουκλεοτιδικών παραλλαγών (SNV) και διαγραφών έως και 25 bp και εισαγωγών 24 bp, όταν χρησιμοποιείται με το λογισμικό της μονάδας Germline και Somatic Variant. Για σωματικές αντιστοιχίσεις, σε συχνότητα παραλλαγής 0,05, ανιχνεύτηκαν διαγραφές 25 bp και εισαγωγές 18 bp.
- Το λογισμικό προσδιορισμού ενδέχεται να μην ευθυγραμμίζει τις αναγνώσεις των αμπλικονίων με ακραίο περιεχόμενο παραλλαγών, με αποτέλεσμα η περιοχή να αναφέρεται ως άγριου τύπου. Τέτοιο ακραίο περιεχόμενο περιλαμβάνει:
 - Αναγνώσεις που περιέχουν περισσότερες από τρεις περιπτώσεις indel.
 - Αναγνώσεις μήκους τουλάχιστον 30 bp με περιεχόμενο SNV μεγαλύτερο από 4% του συνολικού στοχευόμενου μήκους αμπλικονίων (εξαιρουμένων των περιοχών των ανιχνευτών).
 - Αναγνώσεις μήκους μικρότερου των 30 bp με περιεχόμενο SNV μεγαλύτερο από 10% του συνολικού μήκους αμπλικονίων (συμπεριλαμβανομένων των περιοχών των ανιχνευτών).
- Οι μεγάλες παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των πολυνουκλεοτιδικών παραλλαγών (MNV) και των μεγάλων indel, ενδέχεται να αναφερθούν ως χωριστές μικρότερες παραλλαγές στο αρχείο εξόδου VCF.
- Οι παραλλαγές διαγραφής μπορούν να φιλτραριστούν ή να χαθούν όταν περιλαμβάνουν δύο παρακείμενα αμπλικόνια, εάν το μήκος της διαγραφής είναι μεγαλύτερο από ή ίσο με την επικάλυψη μεταξύ των παρακείμενων αμπλικονίων.
- Το σύστημα δεν μπορεί να ανιχνεύσει indel εάν εμφανιστούν απευθείας δίπλα σε έναν εκκινητή και δεν υπάρχει επικαλυπτόμενο αμπλικόνιο. Για περιοχές με επικαλυπτόμενα αμπλικόνια, η δοκιμασία δεν μπορεί να ανιχνεύσει διαγραφές όταν η περιοχή της επικάλυψης είναι μικρότερη από το μέγεθος της διαγραφής που πρέπει να ανιχνευθεί. Για παράδειγμα, εάν η περιοχή της επικάλυψης μεταξύ δύο παρακείμενων αμπλικονίων είναι δύο (2) βάσεις, η δοκιμασία δεν μπορεί να ανιχνεύσει διαγραφές που περιλαμβάνουν και τις δύο αυτές βάσεις. Μπορεί να ανιχνευθεί διαγραφή μίας βάσης σε οποιαδήποτε από αυτές τις δύο βάσεις.
- Όπως με κάθε ροή εργασίας προετοιμασίας βιβλιοθήκης με βάση την υβριδοποίηση, οι υποκείμενοι πολυμορφισμοί, μεταλλάξεις, εισαγωγές ή διαγραφές σε περιοχές δέσμησης ολιγονουκλεοτιδίων μπορούν να επηρεάσουν τα αλληλόμορφα που ανιχνεύονται. Συνεπώς, επηρεάζονται επίσης οι αντιστοιχίσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της αλληλούχισης. Για παράδειγμα:
 - Μια παραλλαγή που συνάδει με μια παραλλαγή στην περιοχή εκκινητή ενδέχεται να μην ενισχυθεί. Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ψευδώς αρνητικό.
 - Οι παραλλαγές στην περιοχή εκκινητή θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ενίσχυση του αλληλόμορφου αναφοράς, με αποτέλεσμα η αντιστοίχιση της ομόζυγης παραλλαγής να είναι εσφαλμένη.
 - Οι παραλλαγές indel στην περιοχή εκκινητή μπορούν να προκαλέσουν μια ψευδώς θετική αντιστοίχιση στο τέλος της ανάγνωσης δίπλα στον εκκινητή.
- Οι περιπτώσεις indel μπορούν να φιλτραριστούν λόγω μεροληψίας αλυσίδας, εάν εμφανιστούν κοντά στο τέλος μίας ανάγνωσης και να συνδεθούν χαλαρά κατά τη διάρκεια της ευθυγράμμισης.
- Οι μικρές MNV δεν έχουν επικυρωθεί.

- Δεν έχουν επικυρωθεί αντίγραφα παραλλαγών αριθμών ή δομικών παραλλαγών, όπως συντήξεις ή μετατοπίσεις.
- Ειδικοί περιορισμοί για την αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς:
 - Το σύστημα MiSeqDx που χρησιμοποιεί τη μονάδα Germline Variant έχει σχεδιαστεί για την παροχή ποιοτικών αποτελεσμάτων για την αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς (π.χ. ομόζυγη, ετερόζυγη, άγριου τύπου).
 - Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μονάδα Germline Variant, η ελάχιστη κάλυψη ανά αμπλικόνιο που χρειάζεται για την ακριβή αντιστοίχιση των παραλλαγών είναι 150x. Ο αριθμός των δειγμάτων και ο συνολικός αριθμός των στοχευόμενων βάσεων επηρεάζουν την κάλυψη. Το περιεχόμενο GC και άλλο γονιδιωματικό περιεχόμενο μπορούν να επηρεάσουν την κάλυψη.
 - Η μεταβλητότητα του αριθμού αντιγράφων μπορεί να επηρεάσει το αν μια παραλλαγή αναγνωρίζεται ως ομόζυγη ή ετερόζυγη.
 - Οι παραλλαγές σε ορισμένο επαναλαμβανόμενο πλαίσιο φιλτράρονται στα αρχεία VCF. Το φίλτρο επανάληψης RMxN χρησιμοποιείται για το φιλτράρισμα παραλλαγών, εάν το σύνολο ή μέρος της αλληλουχίας της παραλλαγής επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα αναφοράς δίπλα στη θέση της παραλλαγής. Για αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς, απαιτούνται τουλάχιστον 9 επαναλήψεις στο γονιδίωμα αναφοράς, προκειμένου να φιλτραριστεί μια παραλλαγή και λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 5 bp (R5x9).
- Ειδικοί περιορισμοί για την αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών:
 - Το σύστημα MiSeqDx που χρησιμοποιεί τη μονάδα Somatic Variant έχει σχεδιαστεί για την παροχή ποιοτικών αποτελεσμάτων για την αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών (π.χ. παρουσία σωματικής παραλλαγής με συχνότητα παραλλαγής ίση με ή μεγαλύτερη από 0,026 με τιμή ορίου ανίχνευσης 0,05).
 - Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μονάδα Somatic Variant, η ελάχιστη κάλυψη ανά αμπλικόνιο που χρειάζεται για την ακριβή αντιστοίχιση των παραλλαγών είναι 450x ανά δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων. Ο αριθμός των δειγμάτων και ο συνολικός αριθμός των στοχευόμενων βάσεων επηρεάζουν την κάλυψη. Το περιεχόμενο GC και άλλο γονιδιωματικό περιεχόμενο μπορούν να επηρεάσουν την κάλυψη.
 - Οι παραλλαγές σε ορισμένο επαναλαμβανόμενο πλαίσιο φιλτράρονται στα αρχεία VCF. Το φίλτρο επανάληψης RMxN χρησιμοποιείται για το φιλτράρισμα παραλλαγών στο σύνολο ή μέρος της αλληλουχίας της παραλλαγής που επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα αναφοράς δίπλα στη θέση της παραλλαγής. Για αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών, απαιτούνται τουλάχιστον 6 επαναλήψεις στο γονιδίωμα αναφοράς, προκειμένου να φιλτραριστεί η παραλλαγή και λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 3 bp (R3x6).
 - Η μονάδα Somatic Variant Module δεν μπορεί να διακρίνει τις παραλλαγές βλαστικής σειράς από τις σωματικές παραλλαγές. Η μονάδα έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση παραλλαγών σε ένα εύρος συχνοτήτων παραλλαγών, αλλά η συχνότητα παραλλαγών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των σωματικών παραλλαγών από τις παραλλαγές βλαστικής σειράς.

- Ο φυσιολογικός ιστός στο δείγμα επηρεάζει την ανίχνευση των παραλλαγών. Το όριο ανίχνευσης που αναφέρεται βασίζεται σε μια συχνότητα παραλλαγής που είναι σχετική με το συνολικό DNA που εκχυλίζεται τόσο από τον καρκινικό όσο και από τον φυσιολογικό ιστό.

Εξαρτήματα προϊόντος

Το Illumina MiSeqDx αποτελείται από τα εξής:

Όργανο MiSeqDx (Αρ. καταλόγου DX-410-1001)

Για τη λειτουργία του οργάνου MiSeqDx και την ανάλυση δεδομένων απαιτούνται τα ακόλουθα στοιχεία λογισμικού:

Εφαρμογή λογισμικού	Λειτουργία	Description (Περιγραφή)
Λειτουργικό λογισμικό MiSeq (MOS)	Ελέγχει τη λειτουργία του οργάνου	Η εφαρμογή λογισμικού MOS διαχειρίζεται τη λειτουργία του οργάνου κατά την αλληλούχηση και δημιουργεί εικόνες για χρήση από το λογισμικό Real-Time Analysis (RTA). Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα <i>Οδηγός αναφοράς οργάνου MiSeqDx για MOS έκδ. 4 (αρ. εγγράφου 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Εκτελεί κύρια ανάλυση	Η εφαρμογή λογισμικού RTA μετατρέπει τις εικόνες που δημιουργήθηκαν από το MOS για κάθε πλακίδιο ανά κύκλο της εκτέλεσης αλληλούχησης σε αρχεία αντιστοίχισης βάσεων, τα οποία αποτελούν στοιχεία εισόδου για τις μονάδες ανάλυσης του Local Run Manager. Η εφαρμογή λογισμικού RTA δεν διαθέτει περιβάλλον χρήστη.
Local Run Manager	Περιβάλλον χρήστη για την επιλογή μονάδας	Το λογισμικό Local Run Manager είναι μια ενσωματωμένη λύση στο όργανο για τη διαχείριση χρηστών, την εκτέλεση δευτερεύουσας ανάλυσης και την παρακολούθηση της κατάστασης. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα <i>Οδηγός αναφοράς λογισμικού Local Run Manager έκδ. 4 για το MiSeqDx (αρ. εγγράφου 200046657)</i> .

Αποθήκευση και χειρισμός

Στοιχείο	Προδιαγραφές
Θερμοκρασία	Μεταφορά και αποθήκευση: -10 °C έως 40 °C (14 °F έως 104 °F) Συνθήκες λειτουργίας: 19 °C έως 25 °C (66 °F έως 77 °F)
Υγρασία	Μεταφορά και αποθήκευση: Υγρασία χωρίς συμπύκνωση Συνθήκες λειτουργίας: Σχετική υγρασία 30–75% (χωρίς συμπύκνωση)

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

Αλληλούχιση αναλωσίμων

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Αρ. καταλόγου 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Αρ. καταλόγου 20063860)

Αναλώσιμα που παρέχονται από τον χρήστη

Βεβαιωθείτε ότι τα παρακάτω αναλώσιμα που παρέχονται από τον χρήστη είναι διαθέσιμα πριν από την έναρξη μιας εκτέλεσης.

Αναλώσιμο	Σκοπός
Μαντηλάκια ισοπροπυλικής αλκοόλης, 70% ή Αιθανόλη, 70%	Καθαρισμός της γυάλινης επιφάνειας της κυψελίδας ροής και του σταδίου
Πανάκια εργαστηρίου, που δεν αφήνουν χνούδι	Καθαρισμός του σταδίου κυψελίδας ροής
Χαρτί φακού, 4 x 6 in.	Καθαρισμός της κυψελίδας ροής
Tween 20	Έκπλυση του οργάνου
Λαβίδα, πλαστική με τετράγωνη μύτη (προαιρετικά)	Αφαίρεση της κυψελίδας ροής από τον περιέκτη αποστολής της
Νερό, εργαστηριακής ποιότητας	Έκπλυση του οργάνου

Κατευθυντήριες γραμμές για το νερό εργαστηριακής ποιότητας

Χρησιμοποιείτε πάντα νερό εργαστηριακής ποιότητας ή απιονισμένο νερό για την εκτέλεση των διαδικασιών του οργάνου. Μη χρησιμοποιείτε ποτέ νερό βρύσης.

Χρησιμοποιείτε μόνο νερό με τις παρακάτω ποιότητες ή ισοδύναμες λύσεις:

- Απιονισμένο νερό
- Illumina PW1
- Νερό 18Megohm (MΩ)
- Νερό Milli-Q
- Νερό Super-Q
- Νερό ποιότητας μοριακής βιολογίας

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις



Προειδοποίηση

Το συγκεκριμένο σετ αντιδραστηρίων περιέχει δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν σωματική βλάβη. Ο αερισμός θα πρέπει να είναι κατάλληλος για τον χειρισμό επικίνδυνων υλικών στα αντιδραστήρια. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας, μεταξύ των οποίων εξοπλισμός προστασίας για τα μάτια, γάντια και εργαστηριακή ποδιά, κατάλληλα για τον κίνδυνο έκθεσης. Τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πρέπει να αντιμετωπίζονται ως χημικά απόβλητα και να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες περιφερειακούς, εθνικούς και τοπικούς νόμους και κανονισμούς. Για πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στο SDS, στη διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.

- Πρέπει να χειρίζεστε όλα τα δείγματα αίματος όπως εάν να ήταν γνωστό ότι είναι μολυσματικά για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), για τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και άλλους παθογόνους παράγοντες που μεταδίδονται με το αίμα (γενικές προφυλάξεις).
- Η μη τήρηση των διαδικασιών όπως περιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ή σημαντική μείωση της ποιότητας των δειγμάτων.
- Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μη χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και εργαστηριακή ρόμπα κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ.
- Η εφαρμογή ορθών εργαστηριακών πρακτικών και η καλή εργαστηριακή υγιεινή είναι απαραίτητες για την αποτροπή της μόλυνσης των αντιδραστηρίων, των οργάνων και των δειγμάτων γονιδιωματικού DNA από τα προϊόντα της PCR. Η μόλυνση της PCR μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή και αναξιόπιστα αποτελέσματα.
- Για την αποτροπή μόλυνσης, διασφαλίστε ότι στις περιοχές πριν από την ενίσχυση και μετά την ενίσχυση υπάρχει ειδικός εξοπλισμός (π.χ. πιπέτες, άκρα πιπετών, συστοιχίες θερμαντικών συσκευών, αναδευτήρες και συσκευές φυγοκέντρησης).
- Όπου είναι κατάλληλο, η σύζευξη ευρετηρίου-δείγματος πρέπει να αντιστοιχεί ακριβώς στην έντυπη διάταξη πλάκας. Το Local Run Manager συμπληρώνει αυτόματα τους εκκινητές ευρετηρίου που σχετίζονται με τα ονόματα δειγμάτων, όταν εισάγονται στη μονάδα. Συνιστάται ο χρήστης να επαληθεύει τους εκκινητές ευρετηρίου που σχετίζονται με τα δείγματα πριν από την έναρξη της εκτέλεσης αλληλούχισης. Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ δείγματος και διάταξης πλάκας έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων και εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων.
- Συνιστάται ιδιαίτερα η εγκατάσταση λογισμικού προστασίας από ιούς που παρέχεται από τον χρήστη για την προστασία του υπολογιστή από ιούς. Συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήστη για οδηγίες σχετικά με την εγκατάσταση.

- Μην χειρίζεστε το MiSeqDx ενώ έχει αφαιρεθεί οποιοσδήποτε από τους πίνακες. Ο χειρισμός του οργάνου ενώ έχει αφαιρεθεί οποιοσδήποτε από τους πίνακες δημιουργεί πιθανή έκθεση στην τάση δικτύου και σε εναλλασσόμενες τάσεις.
- Μην αγγίζετε τη βάση της κυψελίδας ροής μέσα στο διαμέρισμα της κυψελίδας ροής. Η συσκευή θέρμανσης σε αυτό το διαμέρισμα λειτουργεί σε θερμοκρασία από 22 °C έως 95 °C και μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα.
- Το όργανο ζυγίζει περίπου 126 lb και μπορεί να προκαλέσει σοβαρό τραυματισμό σε περίπτωση πτώσης ή εσφαλμένης χρήσης.
- Αναφέρετε αμέσως τυχόντα σοβαρά ατυχήματα που σχετίζονται με αυτό το προϊόν στο Illumina και στις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών στα οποία είναι εγκατεστημένοι ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

Οδηγίες χρήσης

Οι παρακάτω οδηγίες χρήσης του οργάνου MiSeqDx απαιτούν αντιδραστήρια που παρέχονται στο MiSeqDx Reagent Kit v3.

Δημιουργία εκτέλεσης με Local Run Manager

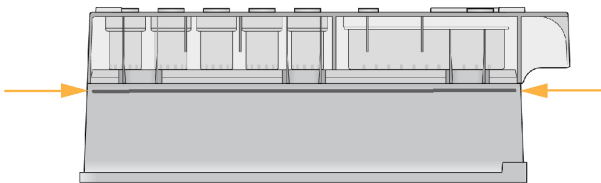
Για λεπτομερείς οδηγίες σχετικά με τη δημιουργία μιας εκτέλεσης, ανατρέξτε στον *Οδηγό αναφοράς λογισμικού Local Run Manager έκδ. 4 για το MiSeqDx* (αρ. εγγράφου 200046657) και στον οδηγό της μονάδας ανάλυσης του Local Run Manager που χρησιμοποιείτε.

Προετοιμασία της κασέτας αντιδραστηρίων

Οι παρακάτω οδηγίες περιγράφουν τον τρόπο απόψυξης των αντιδραστηρίων με χρήση υδατόλουτρου σε θερμοκρασία δωματίου.

1. Αφαιρέστε την κασέτα αντιδραστηρίων από τον χώρο αποθήκευσης όπου βρίσκεται σε θερμοκρασία -15 °C έως -25 °C.
2. Τοποθετήστε την κασέτα αντιδραστηρίων σε υδατόλουτρο που περιέχει αρκετό απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, για να βυθίσετε τη βάση της μέχρι τη γραμμή νερού που είναι τυπωμένη πάνω στην κασέτα αντιδραστηρίων. Μην αφήνετε το νερό να υπερβεί τη μέγιστη γραμμή νερού.

Εικόνα 1 Μέγιστη γραμμή νερού



3. Αφήστε την κασέτα αντιδραστηρίων να αποψυχθεί στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 60–90 λεπτά ή μέχρι να αποψυχθεί πλήρως.

4. Αφαιρέστε την κασέτα από το υδατόλουτρο και χτυπήστε την ελαφρά στον πάγκο, για να απομακρύνετε το νερό από τη βάση της κασέτας. Στεγνώστε τη βάση της κασέτας. Βεβαιωθείτε ότι δεν έχει πιτσιλιστεί νερό στο επάνω μέρος της κασέτας αντιδραστηρίων.

Επιθεώρηση της κασέτας αντιδραστηρίων

1. Αναστρέψτε τη κασέτα αντιδραστηρίων δέκα φορές, για να αναμίξετε τα αποφυγμένα αντιδραστήρια και, στη συνέχεια, επιθεωρήστε ότι έχουν αποψυχθεί όλες οι θέσεις.
2. Επιθεωρήστε τα αντιδραστήρια στις θέσεις 1, 2 και 4, για να βεβαιωθείτε ότι έχουν αναμειχθεί πλήρως και δεν έχουν ιζήματα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Είναι κρίσιμης σημασίας τα αντιδραστήρια στην κασέτα να αποψύχονται πλήρως και να αναμιγνύονται, ώστε να διασφαλίζεται η σωστή αλληλούχιση.

3. Χτυπήστε απαλά την κασέτα στον πάγκο, για να περιορίσετε τις φυσαλίδες αέρα στα αντιδραστήρια.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Τα σωληνάρια αναρρόφησης του MiSeqDx πηγαίνουν στον πυθμένα κάθε δοχείου, για να αναρροφήσουν τα αντιδραστήρια, οπότε είναι σημαντικό τα δοχεία να μην περιέχουν φυσαλίδες αέρα.

4. Τοποθετήστε την κασέτα αντιδραστηρίων σε πάγο ή αφήστε την στην άκρη σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C (έως έξι ώρες) μέχρι να είστε έτοιμοι να ρυθμίσετε την εκτέλεση. Για βέλτιστα αποτελέσματα, φορτώστε απευθείας το δείγμα και καθορίστε τις παραμέτρους της εκτέλεσης.

Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχιση

Για οδηγίες σχετικά με τον τρόπο προετοιμασίας των βιβλιοθηκών δειγμάτων προς αλληλούχιση, συμπεριλαμβανομένης της αραίωσης και της ομαδοποίησης των βιβλιοθηκών, ανατρέξτε στην ενότητα με τις Οδηγίες χρήσης στο αντίστοιχο κιτ προετοιμασίας βιβλιοθηκών.

Η αραίωση των βιβλιοθηκών των δειγμάτων εξαρτάται από την πολυπλοκότητα των ομάδων ολιγονουκλεοτιδίων. Απαιτείται βελτιστοποίηση της πυκνότητας συστάδας στο MiSeqDx και η βέλτιστη πυκνότητα συστάδας ποικίλλει ανάλογα με τον προσδιορισμό προετοιμασίας της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης.

Φόρτωση βιβλιοθηκών δειγμάτων στην κασέτα

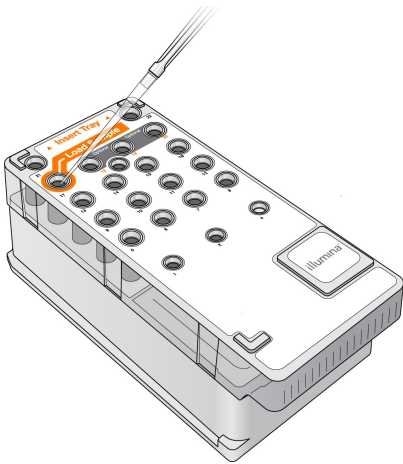
Όταν η κασέτα αντιδραστηρίων αποψυχθεί πλήρως και είναι έτοιμη για χρήση, είστε έτοιμοι να φορτώσετε δείγματα στην κασέτα.

1. Χρησιμοποιήστε ξεχωριστό, καθαρό και κενό ρύγχος πιπέτας του 1 ml, για να τρυπήσετε τη σφράγιση στεγανοποίησης από φύλλο αλουμινίου πάνω από το δοχείο στην κασέτα αντιδραστηρίων με την επισήμανση **Load Samples** (Φόρτωση δειγμάτων).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Μην τρυπάτε άλλες θέσεις αντιδραστηρίων. Οι άλλες θέσεις αντιδραστηρίων τρυπιούνται αυτόματα στη διάρκεια της εκτέλεσης.

2. Διανείμετε με πιπέτα 600 ml των προετοιμασμένων βιβλιοθηκών αραιωμένων δειγμάτων αμπλικονίων (DAL) μέσα στο δοχείο με την ένδειξη **Load Samples** (Φόρτωση δειγμάτων). Μην αγγίζετε τη σφράγιση στεγανοποίησης από φύλλο αλουμινίου.
3. Ελέγξτε για φυσαλίδες αέρα στο δοχείο μετά τη φόρτωση του δείγματος. Εάν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα, κτυπήστε ελαφρά την κασέτα στον πάγκο, για να απελευθερώσετε τις φυσαλίδες.

Εικόνα 2 Φόρτωση βιβλιοθηκών



4. Προχωρήστε απευθείας στα βήματα ρύθμισης της εκτέλεσης χρησιμοποιώντας τη διασύνδεση του λειτουργικού λογισμικού MiSeq (MOS).

Ρύθμιση εκτέλεσης

Ανατρέξτε στην *Οδηγός αναφοράς οργάνου MiSeqDx για MOS έκδ. 4 (αρ. εγγράφου 200010452)* για πλήρεις οδηγίες καθορισμού παραμέτρων της εκτέλεσης.

1. Συνδεθείτε στο MiSeqDx με τον κωδικό πρόσβασης του Local Run Manager λογισμικού σας.
2. Από την οθόνη Home (Αρχική οθόνη) του λογισμικού MOS, επιλέξτε **Sequence** (Αλληλουχία).
3. Επιλέξτε μια εκτέλεση από τη λίστα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Next** (Επόμενο).
Ανοίγει μια σειρά από οθόνες καθορισμού παραμέτρων της εκτέλεσης με την ακόλουθη σειρά: Φόρτωση κυψελίδας ροής, φόρτωση αντιδραστηρίων, ανασκόπηση και έλεγχος πριν από την εκτέλεση.
4. Όταν εμφανιστεί η οθόνη Load Flow Cell (Φόρτωση κυψελίδας ροής), καθαρίστε και, στη συνέχεια, φορτώστε την κυψελίδα ροής.
5. Κλείστε την ασφάλεια κυψελίδας ροής και τη θύρα του διαμερίσματος κυψελίδας ροής.

Τόσο η ασφάλεια όσο και η θύρα διαμερίσματος πρέπει να είναι κλειστά πριν από την έναρξη της εκτέλεσης. Όταν φορτωθεί η κυψελίδα ροής, το λογισμικό διαβάζει και καταγράφει την RFID. Στην κάτω δεξιά γωνία της οθόνης εμφανίζεται μια επιβεβαίωση ότι η RFID διαβάστηκε επιτυχώς.

6. Ακολουθήστε τις οδηγίες του λογισμικού, για να φορτώσετε τη φιάλη διαλύματος MiSeqDx SBS (PR2), να βεβαιωθείτε ότι η φιάλη αποβλήτων είναι άδεια και να φορτώσετε την κασέτα αντιδραστηρίων. Όταν φορτωθεί η φιάλη διαλύματος MiSeqDx SBS (PR2) και η κασέτα αντιδραστηρίων, το λογισμικό διαβάζει και καταγράφει το RFID. Στην κάτω δεξιά γωνία της οθόνης εμφανίζεται μια επιβεβαίωση ότι η RFID διαβάστηκε επιτυχώς.
7. Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει η οθόνη Sequencing (Αλληλούχιση). Σε αυτήν την οθόνη γίνεται μια οπτική αναπαράσταση της εκτέλεσης που βρίσκεται σε εξέλιξη, συμπεριλαμβανομένων των εντάσεων και των βαθμολογιών ποιότητας (Βαθμολογίες ποιότητας).

Αποτελέσματα

Το Real-Time Analysis (RTA) είναι ένα ενσωματωμένο λογισμικό το οποίο εκτελεί ανάλυση εικόνων και αντιστοίχιση βάσης και εκχωρεί μια βαθμολογία ποιότητας σε κάθε βάση για κάθε κύκλο αλληλούχισης. Όταν ολοκληρωθεί η κύρια ανάλυση, η μονάδα στο όργανο MiSeqDx που επιλέγεται στην ενότητα [Δημιουργία εκτέλεσης με Local Run Manager στη σελίδα 8](#) ξεκινά τη δευτερεύουσα ανάλυση. Ανατρέξτε στην ειδική για τον προσδιορισμό τεκμηρίωση για άλλες ροές εργασίας.

Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας

Το λογισμικό MiSeqDx αξιολογεί κάθε εκτέλεση, κάθε δείγμα και κάθε αντιστοίχιση βάσης σε σχέση με τιμές μέτρησης ελέγχου ποιότητας. Όταν απαιτείται, οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που περιλαμβάνονται στην προετοιμασία της βιβλιοθήκης θα πρέπει επίσης να αξιολογούνται για τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Όλες οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο MiSeqDx.

Οι μελέτες βλαστικής σειράς χρησιμοποίησαν είτε τον προσδιορισμό κυστικής ένωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx είτε τα διαγνωστικά αντιδραστήρια του kit TruSeq Custom Amplicon για την προετοιμασία βιβλιοθήκης. Τα δύο kit χρησιμοποιούν πανομοιότυπα αντιδραστήρια προετοιμασίας βιβλιοθήκης και έχουν μόνο μία διαφορά ροής εργασιών: τον αριθμό των κύκλων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (25 και 28, αντίστοιχα). Οι πρόσθετοι κύκλοι PCR επιτρέπουν λιγότερη είσοδο DNA με το διαγνωστικό kit TruSeq Custom Amplicon (50 ng) σε σχέση με τον προσδιορισμό κυστικής ένωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx (250 ng), όπως καταδείχθηκε στη μελέτη εισόδου DNA χρησιμοποιώντας το διαγνωστικό kit TruSeq Custom Amplicon. Οι βιβλιοθήκες που προετοιμάστηκαν με τον προσδιορισμό κυστικής ένωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με τα συνοδευτικά αντιδραστήρια αλληλούχισης στον εξοπλισμό.

Βιβλιοθήκες που προετοιμάστηκαν με τον διαγνωστικό εξοπλισμό TruSeq Custom Amplicon υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με το MiSeqDx Reagent Kit v3. Τα τελευταία αντιδραστήρια αλληλούχισης έχουν αυξημένη απόδοση σε σχέση με εκείνα του προσδιορισμού κυστικής ίνωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx.

Η εξέταση περιλαμβάνει τα εύρη απόδοσης δείγματος που υποστηρίζονται από το MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Το MiSeqDx μπορεί να υποστηρίξει 1–96 δείγματα/εκτέλεση, ανάλογα με τον προσδιορισμό. Το MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro έχει σχεδιαστεί για να υποστηρίζει χαμηλότερη ρυθμαπόδοση δειγμάτων εντός αυτού του εύρους για επιλεγμένους προσδιορισμούς.

Σωματικές μελέτες χρησιμοποίησαν τον διαγνωστικό εξοπλισμό TruSeq Custom Amplicon με το MiSeqDx Reagent Kit v3.

Οι ροές εργασιών βλαστικής σειράς ή σωματικών παραμέτρων, που περιγράφονται για τον διαγνωστικό εξοπλισμό TruSeq Custom Amplicon με σκοπό την προετοιμασία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση, ακολουθήθηκαν με ανάλυση που χρησιμοποίησε τη μονάδα Germline Variant ή τη μονάδα Somatic Variant, αντίστοιχα, με δύο εξαιρέσεις. Μελέτες που χρησιμοποίησαν το ένα γονίδιο (απόδοση germline, προσδιορισμός κυστικής ίνωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx) ή τα δύο γονίδια (απόδοση somatic) ως αντιπροσωπευτικές ομάδες μεταλλάξεων χρησιμοποίησαν ροές εργασίας και μονάδες ανάλυσης ειδικές για τον προσδιορισμό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Το γονιδιωματικό περιεχόμενο των αμπλικονίων συνοψίζεται σε σχέση με τον γονιδιωματικό κλώνο που υποβάλλεται σε αλληλούχιση. Για τα αμπλικόνια που έχουν σχεδιαστεί έναντι του αρνητικού κλώνου, το γονιδιωματικό περιεχόμενο αναφοράς είναι το αντίστροφο συμπλήρωμα (για παράδειγμα, οι περιοχές PolyA στα αμπλικόνια αρνητικού κλώνου αντιστοιχούν στις περιοχές PolyT στο γονιδίωμα αναφοράς).

Ορισμοί των υπολογισμών που χρησιμοποιούνται στα χαρακτηριστικά απόδοσης

- Το θετικό ποσοστό συμφωνίας (PPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που ταξινομούνται ως παραλλαγές από μια μέθοδο αναφοράς που αναφέρει σωστά η δοκιμασία.
 - (Αριθμός περιοχών παραλλαγών που αναφέρθηκαν σωστά από τη δοκιμασία) / (Συνολικός αριθμός περιοχών παραλλαγών)
Οι περιοχές παραλλαγών που αναφέρθηκαν από τη δοκιμασία οι οποίες συμφωνούν με τη μέθοδο αναφοράς είναι αληθώς θετικές (TP). Οι περιοχές παραλλαγών που αναφέρθηκαν ως αντιστοιχίσεις αναφοράς ή ως διαφορετικές αντιστοιχίσεις παραλλαγών από τη δοκιμασία είναι ψευδώς αρνητικές (ΨΑ).
- Το αρνητικό ποσοστό συμφωνίας (NPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που ταξινομούνται ως άγριου τύπου από μια μέθοδο αναφοράς που αναφέρει σωστά η δοκιμασία.
 - (Αριθμός περιοχών άγριου τύπου που αναφέρθηκαν σωστά από τη δοκιμασία) / (Συνολικός αριθμός περιοχών άγριου τύπου)

Οι περιοχές άγριου τύπου που αναφέρθηκαν από τη δοκιμασία και συμφωνούν με τη μέθοδο αναφοράς είναι αληθώς αρνητικές (TN). Οι περιοχές άγριου τύπου που αναφέρονται ως παραλλαγές από τη δοκιμασία είναι ψευδώς θετικές (ΨΘ).

- Το συνολικό ποσοστό συμφωνίας (OPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που αναφέρονται σωστά από τη δοκιμασία και σχετίζονται με μια μέθοδο αναφοράς.
 - $$\frac{[(\text{Αριθμός περιοχών παραλλαγής που αναφέρονται σωστά από τη δοκιμασία}) + (\text{Αριθμός περιοχών άγριου τύπου που αναφέρονται από τη δοκιμασία})]}{[(\text{Συνολικός αριθμός περιοχών παραλλαγής}) + (\text{Συνολικός αριθμός περιοχών άγριου τύπου})]}$$
- Για τις εφαρμογές αντιστοιχίσης παραλλαγών, οι υπολογισμοί PPA, NPA και OPA δεν περιλαμβάνουν μη αντιστοιχίσεις (περιοχές παραλλαγής ή περιοχές αναφοράς που δεν πληρούν ένα ή περισσότερα φίλτρα ποιότητας). Δύο μελέτες δεν περιλαμβάνουν συγκεκριμένα αντιστοιχίσεις στο μετρικό στοιχείο «% σωστών αντιστοιχίσεων» και αυτή η συμπερίληψη των μη αντιστοιχίσεων σημειώνεται για τους ισχύοντες πίνακες.
- Το ποσοστό αντιστοιχίσης υπολογίζεται ως ο συνολικός αριθμός των περιοχών που διέρχονται από τα φίλτρα διαιρούμενος με τον συνολικό αριθμό των θέσεων που υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση για τα χρωμοσώματα 1–22. Τα χρωμοσώματα X και Y εξαιρούνται. Σε αυτήν τη μέτρηση δεν λαμβάνεται υπόψη η συμφωνία των αντιστοιχίσεων με τη μέθοδο αναφοράς.

Για τα χαρακτηριστικά απόδοσης που σχετίζονται με προαναλυτικούς παράγοντες (π.χ. μεθόδους εξαγωγής ή εισαγωγή DNA), ανατρέξτε στο ένθετο συσκευασίας για την ισχύουσα μέθοδο προετοιμασίας βιβλιοθήκης.

Ευρετηρίαση δειγμάτων

Οι εκκινητές ευρετηρίου δείγματος, που προστίθενται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης, εκχωρούν μια μοναδική αλληλουχία σε κάθε DNA δείγματος, επιτρέποντας τη συγκέντρωση πολλαπλών δειγμάτων σε μία εκτέλεση αλληλούχησης. Η ευρετηρίαση δειγμάτων ελέγχθηκε τόσο για τη ροή εργασιών βλαστικής σειράς όσο και για τη ροή εργασιών σωματικών παραλλαγών.

Ένα σύνολο 96 ευρετηρίων δειγμάτων υποβλήθηκαν σε εξέταση με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό, σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις ανά κλώνο και στα 23 ανθρώπινα χρωμοσώματα, για να επαληθευτεί η ικανότητα του προσδιορισμού να δημιουργεί με συνέπεια μια γονοτυπική αντιστοιχίση για ένα συγκεκριμένο δείγμα, σε διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών ευρετηρίου. Το χρωμόσωμα Y δεν περιέχει περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης και δεν αξιολογήθηκε. Οκτώ μοναδικά δείγματα υποβλήθηκαν σε εξέταση με 12 διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών ευρετηρίου ανά δείγμα. Τα αποτελέσματα δειγμάτων από τη μονάδα Germline Variant συγκρίθηκαν με τα Platinum Genomes έκδοσης 2016-01. Το PPA (SNV και indel) υπερέβη το 97% (οι αληθώς θετικές αντιστοιχίσεις ήταν τουλάχιστον 70 για SNV, 38 για εισαγωγές, 36 για διαγραφές) και το NPA ήταν 100% (τουλάχιστον 23.440 θέσεις αναφοράς ανά συνδυασμό ευρετηρίων) για καθέναν από τους 96 συνδυασμούς ευρετηρίων. Εξετάστηκε ανεξάρτητα ένα μεμονωμένο ευρετήριο, για να επαληθευτεί ότι η χημεία αλληλούχησης του MiSeqDx Reagent Kit v3 μπορεί να υποστηρίξει λιγότερα από οκτώ δείγματα (η προηγούμενη χημεία στο MiSeqDx Universal Kit 1.0 περιοριζόταν σε τουλάχιστον οκτώ δείγματα). Ένα μεμονωμένο ευρετήριο είχε τιμές PPA 98,9% (180/182) για SNV, 100% (38/38) για εισαγωγές και 100% (46/46) για διαγραφές. Το NPA ήταν 100% (23.856/23.856).

Εξετάστηκαν δώδεκα αντίγραφα (24 βιβλιοθήκες) ενός δείγματος για τη μέτρηση της ακρίβειας ευρετηρίου με σωματικές παραλλαγές σε συχνότητες από 0,05 έως 0,10 με \χρήση της μονάδας Somatic Variant (χρησιμοποιούνται δύο συνδυασμοί ευρετηρίων ανά αντίγραφο για την πραγματοποίηση σωματικών αντιστοιχίσεων). Το PPA ήταν 100% για SNV (64/64), εισαγωγές (11/11) και διαγραφές (19/19). Το NPA ήταν 100% (τουλάχιστον 11590 θέσεις αναφοράς ανά συνδυασμό ευρετηρίων) για όλους τους συνδυασμούς ευρετηρίων.

Μεταφορά δείγματος

Η ροή εργασιών του οργάνου MiSeqDx περιλαμβάνει προετοιμασία και αλληλούχιση βιβλιοθήκης πολλαπλών δειγμάτων συν μαρτύρων που υποβάλλονται σε επεξεργασία ταυτόχρονα. Η μελέτη μεταφοράς δειγμάτων διεξήχθη για να αξιολογηθεί εάν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μεταφοράς από επιμόλυνση μεταξύ των βοθρίων κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης δειγμάτων και από επιμόλυνση μεταξύ των εκτελέσεων διαδοχικής αλληλούχισης επηρεάζουν τα αποτελέσματα της εξέτασης. Χρησιμοποιήθηκαν σωματικές παραλλαγές, καθώς μπορούν να ανιχνευτούν σε συμβάντα χαμηλότερης συχνότητας αλληλόμορφων από τις παραλλαγές βλαστικής σειράς.

Τα δείγματα περιελάμβαναν τέσσερα δείγματα γονιδιωματικού DNA από κυτταρικές σειρές, καθένα από τα οποία περιείχε μεταλλάξεις από διαφορετικά πάνελ σε έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό δύο γονιδίων. Τα δείγματα ήταν τέτοια ώστε μια μετάλλαξη σε μια θέση στο ένα γονίδιο να έχει μια αλληλουχία αναφοράς (άγριου τύπου) και στα άλλα.

Η μεταφορά από βοθρίο σε βοθρίο ορίζεται ως μια κατάσταση αστοχίας που δημιουργείται δυνητικά από τα βήματα μη αυτόματης επεξεργασίας (διανομή με πιπέτα, ανάμειξη δειγμάτων, κ.λπ.). Για την αξιολόγηση της μεταφοράς από ένα βοθρίο δείγματος σε ένα άλλο, πραγματοποιήθηκαν δύο εκτελέσεις εξετάσεων:

- Μια διάταξη σκακιάρας ενός δείγματος γονιδιωματικού DNA (gDNA) υψηλής εισόδου που περιέχει μια μετάλλαξη στο Γονίδιο 1 που εναλλάσσεται με ένα δείγμα gDNA χαμηλής εισόδου που περιέχει μια μετάλλαξη στο Γονίδιο 2.
- Μια διάταξη σκακιάρας ενός δείγματος gDNA υψηλής εισόδου που περιέχει μια μετάλλαξη στο Γονίδιο 2 που εναλλάσσεται με ένα δείγμα gDNA χαμηλής εισόδου που περιέχει μια μετάλλαξη στο Γονίδιο 1.

Σε κάθε εκτέλεση, αξιολογούνταν συνολικά 12 αντίγραφα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα (π.χ. μια μετάλλαξη του γονιδίου 1 που αναφέρθηκε σε ένα καλά καθορισμένο ως δείγμα με μετάλλαξη γονιδίου 2 ή το αντίστροφο).

Ως μεταφορά μεταξύ των εκτελέσεων ορίζεται μια λειτουργία αστοχίας που δημιουργείται δυνητικά από κατάλοιπα από μια προηγούμενη εκτέλεση αλληλούχισης. Για να προσδιοριστεί εάν υπάρχει μεταφορά μεταξύ των εκτελέσεων αλληλούχισης, προετοιμάστηκαν δύο πλάκες, καθμία από τις οποίες περιείχε 11 αντίγραφα ενός μοναδικού δείγματος gDNA υψηλής εισόδου συν ένα τυφλό δείγμα, τα οποία υποβλήθηκαν σε διαδοχική αλληλούχιση σε ένα όργανο MiSeqDx και αξιολογήθηκαν για ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η πρώτη εκτέλεση περιείχε 11 αντίγραφα ενός δείγματος μεταλλαγμένου γονιδίου 2 συν ένα τυφλό. Η δεύτερη εκτέλεση περιείχε 11 αντίγραφα ενός δείγματος μεταλλαγμένου γονιδίου 1 συν 1 τυφλό. Η βιβλιοθήκη δειγμάτων μεταλλαγμένου γονιδίου 2 υποβλήθηκε σε αλληλούχιση πρώτη και ακολούθησε μια επόμενη εκτέλεση αλληλούχισης με τη βιβλιοθήκη δειγμάτων μεταλλαγμένου γονιδίου 1, ακολουθούμενη από μια

άλλη επαναληπτική εκτέλεση αλληλούχισης της βιβλιοθήκης δειγμάτων μεταλλαγμένου γονιδίου 2. Εάν παρατηρηθούν οποιεσδήποτε μεταλλάξεις του γονιδίου 2 σε μια εκτέλεση μόνο με μεταλλαγμένο γονίδιο 1 και αντίστροφα, αυτό θα υποδείκνυε μεταφορά.

Αναφέρθηκαν μηδενικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (0/24, 0%) λόγω μεταφοράς από βοθρίο σε βοθρίο. Ανιχνεύτηκαν όλες οι αναμενόμενες μεταλλάξεις. Αναφέρθηκαν μηδενικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (0/24, 0%) λόγω μεταφοράς από εκτέλεση σε εκτέλεση. Ανιχνεύτηκαν όλες οι αναμενόμενες μεταλλάξεις. Αναφέρθηκαν μηδενικά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (0/48, 0%) λόγω συνολικής μεταφοράς (από βοθρίο σε βοθρίο και από εκτέλεση σε εκτέλεση συνδυαστικά).

Χαρακτηριστικά απόδοσης Germline

Οι μελέτες που περιγράφονται εδώ χρησιμοποίησαν τη μονάδα Germline Variant για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης, εκτός από τις μελέτες εκείνες που χρησιμοποίησαν το ένα πάνελ γονιδίων όπου χρησιμοποιήθηκε μια ειδική για τον προσδιορισμό μονάδα.

Ακρίβεια

Η ακόλουθη μελέτη διεξήχθη για την αξιολόγηση της ακρίβειας του οργάνου MiSeqDx με το MiSeqDx Reagent Kit v3 και υψηλής ποιότητας DNA. Η μελέτη χρησιμοποίησε μια αντιπροσωπευτική δοκιμασία, σχεδιασμένη για την αναζήτηση πληθώρας γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα με τη χρήση 150 αμπλικονίων. Το χρωμόσωμα Y δεν περιέχει περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης και δεν αξιολογήθηκε. Τα 12 μοναδικά δείγματα που χρησιμοποιούνται σε αυτήν τη μελέτη προέρχονται από μία οικογένεια - δύο γονείς και 10 παιδιά - που υποβάλλονταν συχνά σε αλληλούχιση από πολλαπλά εργαστήρια και μεθοδολογίες αλληλούχισης. Υπάρχουν πέντε δείγματα από γυναίκες και επτά από άνδρες. Το καθένα από τα δείγματα εξετάστηκε εις διπλούν. Η ακρίβεια προσδιορίστηκε για SNV, εισαγωγές και διαγραφές με τη σύγκριση των δεδομένων της μελέτης με μια καλά χαρακτηρισμένη βάση δεδομένων αναφοράς. Η αλληλουχία της βάσης δεδομένων αναφοράς (Platinum Genomes έκδοση 2016-01) προήλθε από τον συνδυασμό πολλαπλών μεθοδολογιών αλληλούχισης, δημόσια διαθέσιμων δεδομένων και κληρονομικών πληροφοριών. Οι γονιδιωματικές περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης καθορίζονται βάσει αυτής της μεθόδου αναφοράς, εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά. Συνολικά, τα δείγματα αναλύθηκαν οκτώ φορές. Οι πίνακες που παρουσιάζονται για να επιδείξουν την ακρίβεια βασίζονται σε δεδομένα από την πρώτη ανάλυση.

Ο **Πίνακας 1** περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης με θετικό και αρνητικό ποσοστό συμφωνίας ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με την καλά χαρακτηρισμένη σύνθετη μέθοδο αναφοράς για τους υπολογισμούς PPA. Οι τρεις τύποι παραλλαγών (SNV, προσθήκες και διαγραφές) συνδυάζονται. Επειδή η μέθοδος αναφοράς παρέχει αποτελέσματα μόνο για τις παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου και για προσθήκες/διαγραφές, τα αποτελέσματα βάσης χωρίς παραλλαγές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19 για υπολογισμούς NPA.

Πίνακας 1 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοιχίσεων βάσης με το όργανο MiSeqDx ανά δείγμα

Δείγμα	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	Συνολικός αριθμός παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΑΘ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός ΑΑ αντιστοιχίσεων	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100

Δείγμα	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	Συνολικός αριθμός παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΑΘ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός ΑΑ αντιστοιχίσεων	PPA	NPA	OPA
NA12878	>99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100
NA12879	>99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	>99,9
NA12880	>99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	>99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	>99,9
NA12882	>99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	>99,9
NA12883	>99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	>99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	>99,9
NA12885	>99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	>99,9
NA12886	>99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	>99,9
NA12888	>99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	>99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Ο αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός περιλάμβανε 150 αμπλικόνια σχεδιασμένα να καλύπτουν ένα εκτεταμένο εύρος γονιδιωματικού περιεχομένου. Το περιεχόμενο GC των αμπλικονίων είχε εύρος 26-87%. Τα αμπλικόνια είχαν, επίσης, εύρος επαναλήψεων ενός νουκλεοτιδίου (π.χ. PolyA, PolyT), δινουκλεοτιδίων και τρινουκλεοτιδίων. Τα δεδομένα συγκεντρώθηκαν ανά αμπλικόνιο (Πίνακας 2), για να προσδιοριστεί η επίδραση του γονιδιωματικού περιεχομένου στο % των σωστών αντιστοιχίσεων. Το % των σωστών αντιστοιχίσεων αποτελείται από αντιστοιχίσεις παραλλαγής και αναφοράς και είναι μικρότερο από 100% εάν υπάρχουν είτε εσφαλμένες είτε καμία αντιστοιχίση. Δεν πραγματοποιούνται αντιστοιχίσεις όταν δεν πληρούνται ένα ή περισσότερα φίλτρα για αντιστοιχίση παραλλαγής (π.χ. ανεπαρκής κάλυψη).

Από τις οκτώ ΨΑ παραλλαγές από τον Πίνακα 2, επτά παρουσιάστηκαν με εισαγωγή 1 bp στο αμπλικόνιο 111, το οποίο περιέχει επίσης ομοπολυμερές PolyA και περιεχόμενο GC 0,29. Η υπολειπόμενη 1 ΨΑ παραλλαγή (εσφαλμένη αντιστοιχίση) οφειλόταν σε αναμενόμενη ετερόζυγη SNV, στο αμπλικόνιο 125 με περιεχόμενο GC 0,68, που ονομάζεται ομόζυγη παραλλαγή. Η συχνότητα SNV παραλλαγών ήταν 0,71 που είναι πάνω από το όριο 0,70 για ταξινόμηση ως ομόζυγη παραλλαγή. Το αμπλικόνιο με το χαμηλότερο % σωστών αντιστοιχίσεων (98,2%) ήταν το αμπλικόνιο 17 με 40 μη αντιστοιχίσεις και περιεχόμενο GC 27%.

Πίνακας 2 Ακρίβεια επιπέδου αμπλικονίων για το όργανο MiSeqDx

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Δ/Ι	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Δ/Ι	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Δ/Ι	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	2112	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Δ/Ι	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Δ/Ι	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Δ/Ι	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Δ/Ι	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Δ/Ι	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Δ/Ι	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
69	11	47470345	47470444	100	100	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Δ/Ι	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Δ/Ι	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Δ/Ι	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Δ/Ι	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
118	18	6980478	6980568	91	91	Δ/Ι	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Δ/Ι	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Δ/Ι	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Δ/Ι	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Δ/Ι	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Δ/Ι	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	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
141	22	32439233	32439329	97	97	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Δ/Ι	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Δ/Ι	0,55	0	0	0	Δ/Ι
149	Y	2655519	2655609	91	0	Δ/Ι	0,48	0	0	0	Δ/Ι
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Δ/Ι

Οι παραλλαγές που δεν ήταν αντιστοιχίσεις συνοψίζονται στον [Πίνακα 3](#). Τα συγκεκριμένα φίλτρα που είχαν ως αποτέλεσμα την απουσία αντιστοιχίσεων παρατίθενται στον πίνακα. Η εισαγωγή στο αμπλικόνιο 111 διηθήθηκε για εννέα από 16 εμφανίσεις με τις υπόλοιπες επτά εμφανίσεις να αντιστοιχίζονται ως αναφορές και ως εκ τούτου να είναι ΨΑ.

Πίνακας 3 Σύνοψη παραλλαγών χωρίς αντιστοιχίσεις

Αρ. αμπλικονίου	Χρ.:Θέση	Παραλλαγή	Αντίστοιχο περιεχόμενο αμπλικονίων	Φίλτρο	Παραλλαγές που παραλείφθηκαν	Αναμενόμενες παραλλαγές	ΨΑ αντιστοιχίσεις
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 ¹	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

¹ R5x9: Επαναλάβετε το φίλτρο. Μια παραλλαγή φιλτράρεται, εάν το σύνολο ή μέρος της παραλλαγής επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα αναφοράς δίπλα στη θέση της παραλλαγής. Απαιτούνται τουλάχιστον εννέα επαναλήψεις αναφοράς και λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 5 bp.

Τα αποτελέσματα αλληλούχησης για το δείγμα NA12878 συγκρίθηκαν με έναν γονότυπο με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης για το NA12878, ο οποίος έχει οριστεί από το National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Από τα 150 αμπλικόνια, 92 αμπλικόνια περιείχονταν πλήρως στις περιοχές υψηλής εμπιστοσύνης του γονιδιώματος, 41 αμπλικόνια ήταν μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενα και 17 αμπλικόνια δεν αλληλεπικαλύπτονταν στην αλληλουχία NIST. Αυτό απέφερε 10.000 συντεταγμένες ανά αντίγραφο για σύγκριση. Αντιστοιχίσεις βάσης μη παραλλαγής συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος 19. Τα αποτελέσματα ακρίβειας αναφέρονται στον [Πίνακα 4](#).

Πίνακας 4 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοιχίσεων βάσης του οργάνου MiSeqDx για δείγμα NA12878 με βάση δεδομένων NIST

Δείγμα	Αριθμός αμπλικονίων	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	Συνολικός αριθμός ΑΘ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΑΑ αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός ΨΘ αντιστοιχίσεων	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Τα δέκα δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω για την αντιστοίχιση μικρών εισαγωγών και διαγραφών (indel) ([Πίνακας 5](#)). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι περιπτώσεις indel ήταν συχνές μεταξύ δύο ή περισσότερων δειγμάτων, όπως αντικατοπτρίζεται στη στήλη «Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel». Τα αποτελέσματα και για τα δύο αντίγραφα των 12 έγκυρων δειγμάτων περιλαμβάνονται στον [Πίνακα 5](#). Υπήρξαν συνολικά 71 περιπτώσεις indel με μέγεθος 1–24 bp για τις εισαγωγές και 1–25 bp για τις διαγραφές. 69 περιπτώσεις indel ανιχνεύτηκαν με θετικό ποσοστό συμφωνίας 100%. Μία διαγραφή (αμπλικόνιο 64, διαγραφή 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) δεν είχε σωστές αντιστοιχίσεις επειδή καθεμία από αυτές τις παραλλαγές ήταν χωρίς αντιστοίχιση λόγω του φίλτρου R5x9. Συνεπώς, δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός του PPA που αποκλείει τις περιπτώσεις χωρίς αντιστοίχιση. Μια άλλη περίπτωση indel, η εισαγωγή 1 bp (chr17 39589692 C>CA στο αμπλικόνιο 111), επίσης δεν είχε σωστές αντιστοιχίσεις επειδή εννέα παραλλαγές ήταν χωρίς αντιστοίχιση λόγω του φίλτρου R5x9 και επτά ήταν αντιστοιχίσεις FN.

Πίνακας 5 Σύνοψη ανίχνευσης Indel με το όργανο MiSeqDx

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
1	1	36450544	93	Διαγραφή 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Διαγραφή 3 bp	ACTT>A	12	0	0	12	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
3	1	218353908	91	Εισαγωγή 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Διαγραφή 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Εισαγωγή 5 bp	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Εισαγωγή 3 bp	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Εισαγωγή 7 bp	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Διαγραφή 6 bp	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Εισαγωγή 5 bp	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Εισαγωγή 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Εισαγωγή 2 bp	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Διαγραφή 23 bp	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Εισαγωγή 9 bp	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Διαγραφή 1 bp	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Διαγραφή 8 bp	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Εισαγωγή 11 bp	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Διαγραφή 4 bp	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Εισαγωγή 8 bp	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
36	6	24950035	92	Διαγραφή 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Διαγραφή 3 bp	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Διαγραφή 25 bp	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Διαγραφή 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Εισαγωγή 1 bp	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Διαγραφή 4 bp	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Εισαγωγή 1 bp	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Διαγραφή 4 bp	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Διαγραφή 11 bp	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Διαγραφή 1 bp	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Εισαγωγή 4 bp	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Εισαγωγή 4 bp	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Διαγραφή 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Διαγραφή 3 bp	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Διαγραφή 16 bp	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Διαγραφή 2 bp	TAC>T	10	10	0	0	Δ/Ι

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
68	11	30177690	70	Εισαγωγή 2 bp	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Εισαγωγή 8 bp	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Διαγραφή 8 bp	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Διαγραφή 2 bp	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Εισαγωγή 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Εισαγωγή 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Εισαγωγή 4 bp	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Διαγραφή 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Διαγραφή 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Εισαγωγή 4 bp	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Διαγραφή 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Διαγραφή 5 bp	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Διαγραφή 6 bp	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Διαγραφή 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Εισαγωγή 3 bp	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Εισαγωγή 4 bp	G>GCTAC	8	0	0	8	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
105	16	85706416	91	Διαγραφή 7 bp	ATTATTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Διαγραφή 1 bp	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Εισαγωγή 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Εισαγωγή 4 bp	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Εισαγωγή 1 bp	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Εισαγωγή 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Διαγραφή 4 bp	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Διαγραφή 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Εισαγωγή 22 bp	T>TGATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Εισαγωγή 3 bp	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Διαγραφή 2 bp	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Διαγραφή 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Εισαγωγή 5 bp	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Εισαγωγή 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Διαγραφή 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Εισαγωγή 11 bp	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
137	21	36710749	87	Διαγραφή 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Διαγραφή 5 bp	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Εισαγωγή 6 bp	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Εισαγωγή 5 bp	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Διαγραφή 10 bp	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

Αναπαραγωγικότητα

Διεξήχθησαν δύο μελέτες για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας του οργάνου MiSeqDx με κυτταρικές σειρές (μελέτη 1 και 2) ή με λευκαφαιρεμένο αίμα ενοφθαλμισμένο με κυτταρικές σειρές (μελέτη 2). Η Μελέτη 1 χρησιμοποίησε πολλαπλά όργανα. Η Μελέτη 2 είχε πολλαπλά εργαστήρια.

Μελέτη 1

Η αναπαραγωγιμότητα του οργάνου MiSeqDx προσδιορίστηκε με τη χρήση δύο οργάνων, δύο χειριστών και δύο παρτίδων αντιδραστηρίων για συνολικά οκτώ εκτελέσεις. Ο αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός, τα δείγματα και η μέθοδος αναφοράς είναι όμοια με όσα περιγράφονται για τη μελέτη ακρίβειας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά αμπλικόνιο για κάθε όργανο (Πίνακας 6), προκειμένου να καταδειχθεί η αναπαραγωγιμότητα των αντιστοιχίσεων μεταξύ των οργάνων. Το % των σωστών αντιστοιχίσεων περιελάμβανε τόσο τις εσφαλμένες όσο και τις μη αντιστοιχίσεις (ένα ή περισσότερα φίλτρα δεν πληρούνται για την αντιστοίχιση των παραλλαγών). Τα όργανα παρήγαγαν παρόμοιους αριθμούς μη αντιστοιχίσεων και λανθασμένων αντιστοιχίσεων ανάλογα με το συγκεκριμένο αμπλικόνιο.

Πίνακας 6 Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας μεταξύ των οργάνων για το MiSeqDx (επίπεδο αμπλικονίων)

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Δ/I	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Δ/I	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Δ/Ι	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Δ/Ι	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικόνιου	Τέλος αμπλικόνιου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθη σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Δ/Ι	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικόνιου	Τέλος αμπλικόνιου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Δ/Ι	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Δ/Ι	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Δ/Ι	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Δ/Ι	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικόνιου	Τέλος αμπλικόνιου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθη σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Δ/Ι	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Δ/Ι	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Δ/Ι	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικόνιου	Τέλος αμπλικόνιου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθη σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Δ/Ι	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικόνιου	Τέλος αμπλικόνιου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθη σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Δ/Ι	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Δ/Ι	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Δ/Ι	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Δ/Ι	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Δ/Ι	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Δ/Ι	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
143	22	37637596	37637694	99	99	Δ/Ι	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	13528854 3	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	13529084 7	71	71	Δ/Ι	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Δ/Ι	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Δ/Ι	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναπαραγωγιμότητας αναλύθηκαν ανά χειριστή με τη χρήση της συχνότητας παραλλαγής (Πίνακας 7). Αυτή η ανάλυση κατέδειξε ότι οι συχνότητες των παραλλαγών ήταν συνεπείς μεταξύ των χειριστών. Παρουσιάζονται οι μέσες συχνότητες παραλλαγών +/- 1 τυπική απόκλιση.

Πίνακας 7 Αποτελέσματα ανά χειριστή για το όργανο MiSeqDx

Εύρος συχνότητας παραλλαγής	Αριθμός μοναδικών παραλλαγών	Συνολικός αριθμός παραλλαγών αναλυμένων από τον χειριστή 1	Συνολικός αριθμός παραλλαγών αναλυμένων από τον χειριστή 2	Μέση (SD) αναφερόμενη συχνότητας παραλλαγής από τον Χειριστή 1	Μέση (SD) αναφερόμενη συχνότητας παραλλαγής από τον Χειριστή 2
Ομόζυγες (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Ετερόζυγες (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναπαραγωγιμότητας για κάθε δείγμα παρουσιάζονται συνδυασμένα και από τις οκτώ εκτελέσεις (Πίνακας 8). Η ανίχνευση αξιολογείται για κάθε τύπο παραλλαγής –SNV, προσθήκες και διαγραφές– ξεχωριστά. Οι θέσεις αναφοράς εξαιρούνται. Αυτή η ανάλυση κατέδειξε ότι τα αποτελέσματα για τις παραλλαγές ήταν αναπαραγωγίμα σε όλα τα δείγματα.

Πίνακας 8 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοιχίσεων βάσης με το όργανο MiSeqDx ανά δείγμα

Δείγμα	SNV					Προσθήκες				Διαγραφές		
	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0

Τα δεδομένα που παρέχονται από τις οκτώ εκτελέσεις σε αυτήν τη μελέτη αναπαραγωγιμότητας υποστηρίζουν τον ισχυρισμό ότι το όργανο MiSeqDx μπορεί να εκτελεί αλλούχιση με συνέπεια:

- Περιεχόμενο GC $\geq 19\%$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 19% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 1,1%)
- Περιεχόμενο GC $\leq 78\%$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 78% αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσεων)
- Μήκη PolyA ≤ 8 (η επανάληψη PolyA 8 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyA = 8)
- Μήκη PolyT ≤ 10 (η επανάληψη PolyT 10 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyT = 10)
- Μήκη PolyG ≤ 7 (η επανάληψη PolyG 7 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyG = 7)

- Μήκη PolyC ≤ 6 (η επανάληψη PolyC 6 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 576 από τα 576 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν PolyC = 6)
- Μήκη επανάληψης δινουκλεοτιδίων $\leq 11x$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν επανάληψη δινουκλεοτιδίων 11x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 0,5%)
- Μήκη επανάληψης τρινουκλεοτιδίων $\leq 5x$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 192 από τα 192 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν επανάληψη τρινουκλεοτιδίων 5x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 0,5%)
- 24 ή λιγότερες εισαγωγές βάσης και 25 ή λιγότερες διαγραφές βάσης
 - 24 εισαγωγές βάσης που αντιστοιχίστηκαν σωστά σε 192 από τα 192 δείγματα
 - Οι 25 διαγραφές βάσης που αντιστοιχίστηκαν σωστά σε 223 δείγματα και αντιστοιχίστηκαν λανθασμένα σε 1 δείγμα από τα 224 δείγματα

Μελέτη 2

Μια μελέτη αναπαραγωγιμότητας μεταξύ εργαστηρίων που πραγματοποιήθηκε με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό, τον προσδιορισμό κυστικής ίνωσης 139 παραλλαγών με τα Illumina MiSeqDx, συμπεριέλαβε ένα υποσύνολο κλινικά σημαντικών γενετικών παραλλαγών *CFTR* που αναλύθηκαν με το λογισμικό MiSeq Reporter χρησιμοποιώντας τη στοχευόμενη ροή εργασιών αλληλούχησης DNA της πλατφόρμας MiSeqDx. Η τυφλοποιημένη μελέτη χρησιμοποίησε 3 εργαστήρια δοκιμής και 2 χειριστές σε κάθε εργαστήριο. Δύο καλά χαρακτηρισμένα πάνελ 46 δειγμάτων εξετάστηκαν από κάθε χειριστή σε κάθε εργαστήριο για συνολικά 810 κλήσεις ανά εργαστήριο. Τα πάνελ περιείχαν ένα μείγμα γονιδιωματικού DNA από κυτταρικές σειρές με γνωστές παραλλαγές στο γονίδιο *CFTR* καθώς και λευκαφαιρεμένο αίμα ενοφθαλμισμένο με κυτταρικές σειρές με γνωστές παραλλαγές στο γονίδιο *CFTR*. Τα δείγματα αίματος παρέχονται ώστε να επιτρέπουν την ενσωμάτωση των βημάτων εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του gDNA που χρησιμεύει ως η κύρια είσοδος για τη ροή εργασιών του προσδιορισμού. Ο ρυθμός επιτυχίας δείγματος, που ορίζεται ως ο αριθμός των δειγμάτων που περνούν επιτυχώς τις μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου με την πρώτη προσπάθεια, ήταν 99,88%. Όλα τα αποτελέσματα των εξετάσεων βασίζονται στην αρχική εξέταση.

Πίνακας 9 Σύνοψη αποτελεσμάτων μελέτης αναπαραγωγιμότητας που διεξήχθησαν με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό κυστικής ένωσης 139 παραλλαγών με το MiSeqDx

Ομάδα (πάνελ) εξετάσεων	Αρ. δείγματος	Γονότυπος δείγματος	Variants (Παραλλαγές)	Σύνολο επισκέψεων ανά κέντρο	Θετικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (παραλλαγές)			Αρνητικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (άγριου τύπου)			Αρ. αναντιστοιχίσεων	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)
					Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3	Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 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
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)	Δεν υπάρχει I506V, I507V, F508C	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100

Ομάδα (πάνελ) εξετάσεων	Αρ. δείγματος	Γονότυπος δείγματος	Variants (Παραλλαγές)	Σύνολο επισκέψεων ανά κέντρο	Θετικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (παραλλαγές)			Αρνητικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (άγριου τύπου)			Αρ. αναντιστοιχίσεων	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)
					Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3	Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3					
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Δ/Ι	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	Δ/Ι	100	100

Ομάδα (πάνελ) εξετάσεων	Αρ. δείγματος	Γονότυπος δείγματος	Variants (Παραλλαγές)	Σύνολο επισκέψεων ανά κέντρο	Θετικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (παραλλαγές)			Αρνητικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (άγριου τύπου)			Αρ. αναντιστοιχίσεων	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)
					Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3	Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3					
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	Δ/Ι	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Δ/Ι	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

Ομάδα (πάνελ) εξετάσεων	Αρ. δείγματος	Γονότυπος δείγματος	Variants (Παραλλαγές)	Σύνολο επισκέψεων ανά κέντρο	Θετικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (παραλλαγές)			Αρνητικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (άγριου τύπου)			Αρ. αναντιστοιχίσεων	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)
					Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3	Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3					
B	54	394delITT (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	Δ/Ι	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Δ/Ι	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

Ομάδα (πάνελ) εξετάσεων	Αρ. δείγματος	Γονότυπος δείγματος	Variants (Παραλλαγές)	Σύνολο επισκέψεων ανά κέντρο	Θετικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (παραλλαγές)			Αρνητικές αντιστοιχίσεις συμφωνίας (άγριου τύπου)			Αρ. αναντιστοιχίσεων	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Θετική συμφωνία (%)	Αρνητική συμφωνία (%)	Συνολική συμφωνία (%)
					Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3	Εργαστήριο 1	Εργαστήριο 2	Εργαστήριο 3					
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	Δ/Ι	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 ⁴	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 ⁴	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Δ/Ι	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
Σύνολο				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

¹ Η θέση άγριου τύπου που αντιστοιχεί στην παραλλαγή N1303K για ένα αντίγραφο είχε ως αποτέλεσμα τη μη αντιστοίχιση λόγω ανεπαρκούς κάλυψης.

² Ένα αντίγραφο των δειγμάτων 5 και 75 είχε ρυθμό αντιστοίχισης 0%. Περαιτέρω έρευνα υποδεικνύει ότι τα δείγματα μπορεί να μην έχουν προστεθεί στην πλάκα δειγμάτων πριν από την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, επειδή οι όγκοι δειγμάτων που απομένουν στα σωληνάρια ήταν συνεπείς και δεν είχε αφαιρεθεί όγκος.

³ Τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα δείγματα 9 και 10 ήταν πιθανό να άλλαξαν από τον χειριστή πριν από την προετοιμασία της βιβλιοθήκης.

⁴ Η θέση άγριου τύπου που αντιστοιχεί στην παραλλαγή M1V για ένα αντίγραφο από τα δύο δείγματα είχε ως αποτέλεσμα τη μη αντιστοίχιση λόγω ανεπαρκούς κάλυψης.

Χαρακτηριστικά απόδοσης Somatic

Οι μελέτες που περιγράφονται εδώ χρησιμοποίησαν τη μονάδα Somatic Variant για την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης, εκτός από τις μελέτες εκείνες που χρησιμοποίησαν δύο πάνελ γονιδίων όπου χρησιμοποιήθηκε μια ειδική για τον προσδιορισμό μονάδα.

Ακρίβεια

Διεξήχθησαν τρεις μελέτες για την αξιολόγηση της ακρίβειας του οργάνου MiSeqDx με DNA που εξήχθη από δείγματα FFPE.

Μελέτη 1

Η μελέτη χρησιμοποίησε μια αντιπροσωπευτική δοκιμασία, σχεδιασμένη για την αναζήτηση πληθώρας γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα με τη χρήση 150 αμπλικονίων. Το χρωμόσωμα Y δεν περιέχει περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης και δεν αξιολογήθηκε. Τα πέντε μοναδικά δείγματα που χρησιμοποιούνται σε αυτήν τη μελέτη προέρχονται από μία οικογένεια - δύο γονείς και τρία παιδιά - που υποβάλλονταν συχνά σε αλληλούχιση από πολλαπλά εργαστήρια και μεθοδολογίες αλληλούχισης. Υπάρχουν τρία δείγματα από γυναίκες και δύο από άνδρες. Όλα τα δείγματα ήταν μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη πριν από την εξαγωγή του DNA για τη μελέτη. Το δείγμα GM12877 αραιώθηκε, σε επίπεδο DNA, με το δείγμα GM12878 για τη δημιουργία του GM12877-D, ώστε να δημιουργηθεί ένα σύνολο παραλλαγών με συχνότητες κοντά στο 5% και το 10%. Το καθένα από τα δείγματα εξετάστηκε εις διπλούν εκτός από το GM12877-D, το οποίο εξετάστηκε με πέντε αντίγραφα. Η ακρίβεια προσδιορίστηκε για SNV, εισαγωγές και διαγραφές με τη σύγκριση των δεδομένων της μελέτης με μια καλά χαρακτηρισμένη βάση δεδομένων αναφοράς. Η αλληλουχία της βάσης δεδομένων αναφοράς (Platinum Genomes έκδοση 2016-01) προήλθε από τον συνδυασμό πολλαπλών μεθοδολογιών αλληλούχισης, δημόσια διαθέσιμων δεδομένων και κληρονομικών πληροφοριών. Οι γονιδιωματικές περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης καθορίζονται βάσει αυτής της μεθόδου αναφοράς, εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά. Συνολικά, τα δείγματα αναλύθηκαν οκτώ φορές. Οι πίνακες που παρουσιάζονται για να επιδείξουν την ακρίβεια βασίζονται σε δεδομένα από την πρώτη ανάλυση.

Ο Πίνακας 10 περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης με θετικό και αρνητικό ποσοστό συμφωνίας ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με την καλά χαρακτηρισμένη σύνθετη μέθοδο αναφοράς για τους υπολογισμούς PPA. Οι τρεις τύποι παραλλαγών (SNV, προσθήκες και διαγραφές) συνδυάζονται. Επειδή η μέθοδος αναφοράς παρέχει αποτελέσματα μόνο για τις παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου και για προσθήκες/διαγραφές, τα αποτελέσματα βάσης χωρίς παραλλαγές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19 για υπολογισμούς NPA.

Πίνακας 10 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοίχισης βάσεων με το όργανο MiSeqDx σύμφωνα με δεδομένα αναφοράς για 6 καλά χαρακτηρισμένα δείγματα

Δείγμα	Μέσο ποσοστό αντιστοίχισης	Συνολικός αριθμός παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΑΘ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός AA αντιστοιχίσεων	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 Παραλλαγές με συχνότητα μεγαλύτερη από 20%.

² Παραλλαγή με συχνότητα μικρότερη από 20%.

Τα 150 αμπλικόνια σχεδιάστηκαν ώστε να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος γονιδιωματικού περιεχομένου. Το περιεχόμενο GC των αμπλικονίων είχε εύρος 26-87%. Τα αμπλικόνια είχαν επίσης ένα εύρος μονονουκλεοτιδικών (π.χ. PolyA, PolyT), δινουκλεοτιδικών και τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων. Χρησιμοποιήθηκαν 6 μοναδικά δείγματα στον προσδιορισμό. Τα δεδομένα συγκεντρώθηκαν ανά αμπλικόνιο (Πίνακας 11), για να προσδιοριστεί η επίδραση του γονιδιωματικού περιεχομένου στο % των σωστών αντιστοιχίσεων. Το % των σωστών αντιστοιχίσεων αποτελείται από αντιστοιχίσεις παραλλαγής και αναφοράς και είναι μικρότερο από 100% εάν υπάρχουν είτε εσφαλμένες είτε καμία αντιστοίχιση. Δεν πραγματοποιούνται αντιστοιχίσεις όταν δεν πληρούνται ένα ή περισσότερα φίλτρα για αντιστοίχιση παραλλαγής (π.χ. ανεπαρκής κάλυψη). Δεν υπήρξαν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις. Ο αριθμός των μη αντιστοιχίσεων διέφερε σημαντικά μεταξύ των αμπλικονίων. Το περιεχόμενο GC και αρκετές αλληλεπιδράσεις με το περιεχόμενο GC ήταν οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες μη αντιστοιχίσεων. 2040/2580 (79%) των μη αντιστοιχίσεων οφείλονταν σε μη εκπλήρωση των προδιαγραφών κάλυψης. Τα αμπλικόνια με περιεχόμενο GC μεγαλύτερο από 78% είχαν ως αποτέλεσμα τις περισσότερες μη αντιστοιχίσεις. Ένα αντιπροσωπευτικό αμπλικόνιο με περιεχόμενο GC 78% είχε συνολικά 675 μη αντιστοιχίσεις.

Ένα αντιπροσωπευτικό αμπλικόνιο με περιεχόμενο 87% είχε συνολικά 1365 μη αντιστοιχίσεις. Η κάλυψη μπορεί να αυξηθεί μειώνοντας τον αριθμό των δειγμάτων που είναι φορτωμένα στην κυψελίδα ροής, γεγονός που μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση σε αμπλικόνια με υψηλό περιεχόμενο GC.

Πίνακας 11 Δεδομένα ακρίβειας επιπέδου αμπλικονίων

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Δ/Ι	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Δ/Ι	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Δ/Ι	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Δ/Ι	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
43	7	22202076	22202148	73	73	Δ/Ι	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG (4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Δ/Ι	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Δ/Ι	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Δ/Ι	0,51	1215	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
67	11	8159816	8159912	97	96	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Δ/Ι	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Δ/Ι	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA (3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Δ/Ι	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Δ/Ι	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Δ/Ι	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
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	Δ/Ι	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Δ/Ι	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Δ/Ι	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Δ/Ι	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Δ/Ι	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Δ/Ι	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	1029	0	7	99,3

Αμπλικονίο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	% σωστών αντιστοιχίσεων
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Δ/Ι	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Δ/Ι	0,55	0	0	0	Δ/Ι
149	Y	2655519	2655609	91	0	Δ/Ι	0,48	0	0	0	Δ/Ι
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Δ/Ι

Οι παραλλαγές που δεν ήταν αντιστοιχίσεις συνοψίζονται στον [Πίνακα 12](#). Τα συγκεκριμένα φίλτρα που είχαν ως αποτέλεσμα την απουσία αντιστοιχίσεων παρατίθενται στον πίνακα.

Πίνακας 12 Σύνοψη παραλλαγών χωρίς αντιστοιχίσεις

Αρ. αμπλικονίου	Χρ.:Θέση	Παραλλαγή	Αντίστοιχο περιεχόμενο αμπλικονίων	Φίλτρο	Παραλλαγές που παραλείφθηκαν	Αναμενόμενες παραλλαγές
28	5:1882129	T > G	78% GC	Χαμηλή διαφορική πίεση 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	Χαμηλή διαφορική πίεση	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

¹ Χαμηλή διαφορική πίεση: Χαμηλή κάλυψη. Μια παραλλαγή φιλτράρεται αν το βάθος σε τουλάχιστον μία από τις δεξαμενές στη συγκεκριμένη θέση είναι κάτω από 900.

² R3x6: Επαναλάβετε το φίλτρο. Μια παραλλαγή φιλτράρεται, εάν το σύνολο ή μέρος της παραλλαγής επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα αναφοράς δίπλα στη θέση της παραλλαγής. Απαιτούνται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις αναφοράς και λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 3 bp.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για το δείγμα συγκρίθηκαν με έναν γονότυπο με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης για το NA12878, ο οποίος έχει οριστεί από το National Institute of Standards and Technology (NIST) (έκδ.2.19). Από τα 150 αμπλικόνια, 92 αμπλικόνια περιέχονταν πλήρως στις περιοχές υψηλής εμπιστοσύνης του γονιδιώματος, 41 αμπλικόνια ήταν μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενα και 17 αμπλικόνια δεν αλληλεπικαλύπτονταν στην αλληλουχία NIST. Αυτό απέφερε 10.000 συντεταγμένες ανά αντίγραφο για σύγκριση. Αντιστοιχίσεις βάσης μη παραλλαγής συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19. Τα αποτελέσματα ακρίβειας αναφέρονται στον [Πίνακας 13](#).

Πίνακας 13 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοίχισης βάσεων με το όργανο MiSeqDx με τα δεδομένα αναφοράς του NIST για δείγμα GM12878

Δείγμα	Αριθμός αμπλικονίων	Μέσο ποσοστό αντιστοίχισης	Συνολικός αριθμός ΑΘ αντιστοιχίσεων παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ αντιστοιχίσεων παραλλαγών	Συνολικός αριθμός AA αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός ΨΘ αντιστοιχίσεων	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Τα πέντε δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω για την αντιστοίχιση μικρών εισαγωγών και διαγραφών (indel) ([Πίνακας 14](#)). Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι περιπτώσεις indel ήταν συχνές μεταξύ δύο ή περισσότερων δειγμάτων, όπως αντικατοπτρίζεται στη στήλη «Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel». Τα αποτελέσματα και για τα δύο αντίγραφα των πέντε δειγμάτων περιλαμβάνονται στον [Πίνακας 14](#). Υπήρξαν συνολικά 71 περιπτώσεις indel με μέγεθος 1–24 bp για τις εισαγωγές και 1–25 bp για τις διαγραφές. 68 περιπτώσεις indel ανιχνεύτηκαν με θετικό ποσοστό συμφωνίας 1. Τρεις εισαγωγές και διαγραφές δεν είχαν σωστές αντιστοιχίσεις, επειδή καθεμία από αυτές τις παραλλαγές ήταν χωρίς αντιστοίχιση λόγω του φίλτρου R3x6. Συνεπώς, δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός του PPA που αποκλείει τις περιπτώσεις χωρίς αντιστοίχιση. Οι τρεις παραλλαγές ήταν η διαγραφή 1 bp (chr8 24811064 AG>A), η διαγραφή 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) και η εισαγωγή 1 bp (chr17 39589692 C>CA).

Πίνακας 14 Σύνοψη ανίχνευσης Indel με το όργανο MiSeqDx

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
1	1	36450544	93	Διαγραφή 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Διαγραφή 3 bp	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Εισαγωγή 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
4	1	223906701	92	Διαγραφή 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Εισαγωγή 5 bp	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Εισαγωγή 3 bp	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Εισαγωγή 7 bp	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Διαγραφή 6 bp	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Εισαγωγή 5 bp	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Εισαγωγή 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Εισαγωγή 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Διαγραφή 23 bp	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Εισαγωγή 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Διαγραφή 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Διαγραφή 8 bp	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Εισαγωγή 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Διαγραφή 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Εισαγωγή 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Διαγραφή 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCACCA>C	11	0	0	11	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
37	6	31084942	100	Διαγραφή 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Διαγραφή 25 bp	CTTTCACCTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Διαγραφή 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Εισαγωγή 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Διαγραφή 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Εισαγωγή 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Διαγραφή 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Διαγραφή 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Διαγραφή 1 bp	AG>A	15	15	0	0	Δ/Ι
53	8	76518677	67	Εισαγωγή 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Εισαγωγή 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Διαγραφή 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Διαγραφή 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Διαγραφή 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Διαγραφή 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Εισαγωγή 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
70	11	59837721	62	Εισαγωγή 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Διαγραφή 8 bp	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Διαγραφή 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Εισαγωγή 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Εισαγωγή 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Εισαγωγή 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Διαγραφή 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Διαγραφή 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Εισαγωγή 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Διαγραφή 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Διαγραφή 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Διαγραφή 6 bp	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Διαγραφή 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Εισαγωγή 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Εισαγωγή 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Διαγραφή 7 bp	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
107	17	3594276	87	Διαγραφή 1 bp	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Εισαγωγή 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Εισαγωγή 4 bp	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	Εισαγωγή 1 bp	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Εισαγωγή 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Διαγραφή 4 bp	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Διαγραφή 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Εισαγωγή 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Εισαγωγή 3 bp	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Διαγραφή 2 bp	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Διαγραφή 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Εισαγωγή 5 bp	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Εισαγωγή 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Διαγραφή 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Εισαγωγή 11 bp	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Διαγραφή 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Θέση	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Τύπος και μήκος των Indel αμπλικονίων	Indel	Συνολικός αριθμός αντιγράφων δειγμάτων με Indel	Αρ. μη αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός εσφαλμένων αντιστοιχίσεων Indel	Συνολικός αριθμός σωστών αντιστοιχίσεων Indel	PPA
138	21	46644985	69	Διαγραφή 5 bp	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Εισαγωγή 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Εισαγωγή 5 bp	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Διαγραφή 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

Μελέτη 2

Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε αποθηκευμένα δείγματα ιστού FFPE ορθοκολικού καρκίνου και έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό δύο γονιδίων, ο οποίος συγκρίθηκε με τη μέθοδο αναφοράς, την αμφίδρομη αλληλούχιση Sanger (Sanger). Από τους 1183 συνολικά συμμετέχοντες, 441 συμμετέχοντες είχαν έγκυρα αποτελέσματα Sanger και αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα προσδιορισμού. Όταν αξιολογήθηκαν σε επίπεδο ασθενούς (Πίνακας 15), 230 από τους 441 ασθενείς ήταν θετικοί κατά Sanger (μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε μέσω αλληλούχισης Sanger). Από αυτές, 227 ήταν θετικές σύμφωνα με τον αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό. Οι υπόλοιποι 211 από τους 441 ασθενείς ήταν αρνητικοί από κατά Sanger (δεν ανιχνεύθηκε μετάλλαξη μέσω αλληλούχισης Sanger). Από αυτές, 206 ήταν αρνητικές σύμφωνα με τον αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό. Αυτό οδήγησε σε θετικό ποσοστό συμφωνίας (PPA) 98,7% και αρνητικό ποσοστό συμφωνίας (NPA) 97,6% (Πίνακας 15).

Πίνακας 15 Θετικό και αρνητικό ποσοστό συμφωνίας των αποτελεσμάτων σε επίπεδο ασθενούς

Αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός	Sanger		Σύνολο
	Θετικό	Αρνητικό	
Θετικό	227 ¹	5	232
Αρνητικό	3 ²	206	209
Απόδοση Περίληψη			
Συμφωνία Στατιστικά στοιχεία	Εκτίμηση σημείου	Ακριβές CI 95%	

Αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός	Sanger		Σύνολο
	Θετικό	Αρνητικό	
Σύνολο	230	211	441

Απόδοση Περίληψη		
Συμφωνία Στατιστικά στοιχεία	Εκτίμηση σημείου	Ακριβές CI 95%
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%, 99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%, 99,2%]

¹Υπήρχαν 224 ακριβείς αντιστοιχίες για αποτελέσματα επιπέδου όλων των μεταλλάξεων στον ίδιο ασθενή. Για δύο ασθενείς, το MiSeqDx ανίχνευσε μια μετάλλαξη μέσω αλληλούχησης Sanger και μία επιπλέον μετάλλαξη. Για έναν ασθενή, το MiSeqDx και η αλληλούχηση Sanger ανίχνευσαν διαφορετικές μεταλλάξεις.

²Ένας ασθενής είχε δύο μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν μέσω αλληλούχησης Sanger. Δύο ασθενείς είχε μία μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε μέσω αλληλούχησης Sanger.

Μελέτη 3

Αυτή η μελέτη αξιολόγησε βιβλιοθήκες DNA που παρασκευάστηκαν με δείγματα FFPE σε πολλαπλούς τύπους ιστών. Συνολικά 109 δείγματα FFPE από οκτώ διαφορετικούς ιστούς (παχύ έντερο, ωθήκη, πάγκρεας, επινεφρίδια, ουροδόχος κύστη, ήπαρ, θυρεοειδής και μαστός) με τουλάχιστον 11 δείγματα FFPE που αντιπροσωπεύουν κάθε τύπο ιστού). Ο επινεφριδιακός ιστός περιελάμβανε μετάσταση από όγκους του οισοφάγου, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Ο άλλος ιστός είχε πρωτοπαθείς όγκους. Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός μιας αντιπροσωπευτικής δοκιμασίας για την αναζήτηση 26 γονιδίων που καλύπτουν 21.577 βάσεις σε 17 διαφορετικά χρωμοσώματα. Συνολικά έξι διαφορετικά γονίδια (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* και *BRAF*) υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση Sanger με κάθε όγκο να έχει 1-3 γονίδια με αλληλούχηση Sanger με βάση τον αναμενόμενο επιπολασμό σωματικών μεταλλάξεων για τον συγκεκριμένο όγκο. Τα αποτελέσματα αλληλούχησης Sanger ταυτοποίησαν 39 σωματικές μεταλλάξεις SNV σε 33 από τα 109 δείγματα FFPE. Το MiSeqDx ταυτοποίησε 36 σωματικές μεταλλάξεις SNV σε 32 από τα 109 δείγματα FFPE με μία ψευδώς αρνητική και δύο παραλλαγές θέσεων χωρίς αντιστοιχίσεις. Το PPA ήταν 97,3%. Το MiSeqDx ταυτοποίησε 78.975 βάσεις αναφοράς στα 109 δείγματα FFPE με 29 ψευδώς θετικά σε σχέση με την αλληλούχηση Sanger και 3416 χωρίς αντιστοιχίσεις. Το NPA ήταν 99,9%. Μια διαγραφή δύο βάσεων ήταν σύμφωνη μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο [Πίνακας 16](#) συνοψίζει τα αποτελέσματα ανά τύπο ιστού.

Πίνακας 16 Θετικό και αρνητικό ποσοστό συμφωνίας ανά τύπο ιστού

Τύπος ιστού	Αρ. δειγμάτων	Συνολικός αριθμός παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΑΘ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός ΨΑ παραλλαγών	Συνολικός αριθμός AA αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός ΨΘ αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	PPA	NPA
Επινεφρίδια	16	6	4	1	11823	2	607	80	>99,9
Ουροδόχος κύστη	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Μαστός	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Παχύ έντερο	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Ήπαρ	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Ωοθήκη	13	7	7	0	10581	1	724	100	>99,99
Πάγκρεας	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Θυρεοειδής	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Σύνολο	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	>99,9

Αναπαραγωγικότητα

Διεξήχθησαν δύο μελέτες για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας του οργάνου MiSeqDx με DNA που εξήχθη από δείγματα FFPE. Η Μελέτη 1 χρησιμοποίησε πολλαπλά όργανα. Η Μελέτη 2 είχε πολλαπλά εργαστήρια.

Μελέτη 1

Η αναπαραγωγικότητα του οργάνου MiSeqDx προσδιορίστηκε με τη χρήση δύο οργάνων, δύο εκπαιδευμένων χειριστών για συνολικά οκτώ εκτελέσεις. Ο αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός, το γονιδιακό περιεχόμενο των αμπλικονίων, τα δείγματα και η μέθοδος αναφοράς είναι όμοια με όσα περιγράφονται για τη μελέτη ακρίβειας 1 παραπάνω. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά αμπλικόνιο για κάθε όργανο (Πίνακας 17), προκειμένου να καταδειχθεί η αναπαραγωγικότητα των αντιστοιχίσεων μεταξύ των οργάνων. Το % των σωστών αντιστοιχίσεων περιελάμβανε τόσο τις εσφαλμένες όσο και τις μη αντιστοιχίσεις (ένα ή περισσότερα φίλτρα δεν πληρούνται για την αντιστοίχιση των παραλλαγών). Τα όργανα παρήγαγαν παρόμοιους αριθμούς μη αντιστοιχίσεων ανάλογα με το συγκεκριμένο αμπλικόνιο. Για το MiSeqDx 1 παρατηρήθηκε μία μεμονωμένη εσφαλμένη αντιστοίχιση σε μια περιοχή με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης, όπως ορίζεται από το πρότυπο αναφοράς Platinum Genomes. Η εσφαλμένη αντιστοίχιση ήταν μια ψευδώς θετική αντιστοίχιση μιας παραλλαγής εισαγωγής στο χρωμόσωμα 10 διερεύνησης του αμπλικονίου 64 στις θέσεις 55892599 έως 55892687. Το αμπλικόνιο είχε δινουκλεοτιδική επανάληψη 11.

Πίνακας 17 Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας μεταξύ των οργάνων της μελέτης για το MiSeqDx (επίπεδο αμπλικονίων)

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Δ/Ι	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Δ/Ι	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Δ/Ι	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Δ/Ι	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Δ/Ι	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	PolyA (7), AG (4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Δ/Ι	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	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	Δ/Ι	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Δ/Ι	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Δ/Ι	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC (4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Δ/Ι	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
83	13	73	73	Δ/Ι	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Δ/Ι	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Δ/Ι	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Δ/Ι	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Δ/Ι	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG (3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), 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	Δ/Ι	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Δ/Ι	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Δ/Ι	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Δ/Ι	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Δ/Ι	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων	Σύνολο σωστών αντιστοιχίσεων	Σύνολο εσφαλμένων αντιστοιχίσεων	Συνολικός αριθμός μη αντιστοιχίσεων
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA (3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG (3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Δ/Ι	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Δ/Ι	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Δ/Ι	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναπαραγωγιμότητας αναλύθηκαν ανά χειριστή με τη χρήση της συχνότητας παραλλαγής (Πίνακας 18). Αυτή η ανάλυση κατέδειξε ότι οι συχνότητες των παραλλαγών ήταν συνεπείς μεταξύ των χειριστών. Παρουσιάζονται οι μέσες συχνότητες παραλλαγών +/- 1 τυπική απόκλιση.

Πίνακας 18 Αποτελέσματα ανά χειριστή για το όργανο MiSeqDx

Εύρος συχνότητας παραλλαγής	Αριθμός μοναδικών παραλλαγών	Συνολικός αριθμός παραλλαγών αναλυμένων από τον χειριστή 1	Συνολικός αριθμός παραλλαγών αναλυμένων από τον χειριστή 2	Μέση (SD) αναφερόμενη συχνότητας παραλλαγής από τον Χειριστή 1	Μέση (SD) αναφερόμενη συχνότητας παραλλαγής από τον Χειριστή 2
Υψηλή συχνότητα (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Μεσαία συχνότητα (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Χαμηλή συχνότητα (3-7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Τα αποτελέσματα της μελέτης αναπαραγωγιμότητας για κάθε δείγμα παρουσιάζονται συνδυασμένα και από τις οκτώ εκτελέσεις (Πίνακας 19). Η ανίχνευση αξιολογείται ξεχωριστά για κάθε τύπο παραλλαγής –SNV, εισαγωγές και διαγραφές ξεχωριστά. Οι θέσεις αναφοράς εξαιρούνται. Αυτή η ανάλυση κατέδειξε ότι τα αποτελέσματα για τις παραλλαγές ήταν αναπαραγωγίμα σε όλα τα δείγματα.

Πίνακας 19 Συμφωνία των αποτελεσμάτων αντιστοιχίσεων βάσης με το όργανο MiSeqDx ανά δείγμα

Δείγμα	SNV				Προσθήκες				Διαγραφές			
	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA	Συνολικός αριθμός	Συνολικός αριθμός AΘ	Συνολικός αριθμός ΨΘ	Συνολικός αριθμός AA
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

¹Παραλλαγές με συχνότητα μεγαλύτερη από 20%.

²Παραλλαγή με συχνότητα μικρότερη από 20%.

Τα δεδομένα που παρέχονται από τις 8 εκτελέσεις σε αυτήν τη μελέτη αναπαραγωγιμότητας υποστηρίζουν τον ισχυρισμό ότι το όργανο MiSeqDx μπορεί να εκτελεί αλλοίχιση με συνέπεια:

- Περιεχόμενο GC \geq 19% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 120 από τα 120 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 19% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 3,4%)
- Περιεχόμενο GC \leq 73% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 120 από τα 120 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 73% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 0,1%)
- Μήκη PolyA \leq 8 (η επανάληψη PolyA 8 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 120 από τα 120 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyA = 8)
- Μήκη PolyT \leq 10 (η επανάληψη PolyT 10 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 120 από τα 120 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyT = 10)
- Μήκη PolyG \leq 6 (η επανάληψη PolyG 6 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 720 από τα 720 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν PolyG = 6)

- Μήκη PolyC ≤ 6 (η επανάληψη PolyC 6 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκε σωστά σε 359 από τα 360 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν PolyC = 6, με 1 μη αντιστοίχιση)
- Μήκη επανάληψης δινουκλεοτιδίων $\leq 4x$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 600 από τα 600 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν επανάληψη δινουκλεοτιδίων 4x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 0,4%)
- Μήκη επανάληψης τρινουκλεοτιδίων $\leq 5x$ (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 120 από τα 120 αμπλικόνια αλληλούχησης που περιέχουν επανάληψη τρινουκλεοτιδίων 5x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοίχισης 1,9%)
- 24 ή λιγότερες εισαγωγές βάσης και 25 ή λιγότερες διαγραφές βάσης
 - 24 εισαγωγές βάσης που αντιστοιχίστηκαν σωστά σε 120 από τα 120 δείγματα
 - Οι 25 διαγραφές βάσης που αντιστοιχίστηκαν σωστά σε 182 δείγματα και αναφέρθηκαν ως μη αντιστοίχιση σε 2 δείγματα από τα 184 δείγματα

Μελέτη 2

Πραγματοποιήθηκε μια εξωτερική μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας του αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού δύο γονιδίων, που περιγράφεται στη μελέτη ακρίβειας 2, σε τρία εξωτερικά εργαστήρια εξέτασης (δύο χειριστές ανά εργαστήριο), σε μία παρτίδα αντιδραστηρίων και σε τρεις μη διαδοχικές ημέρες εξέτασης. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε με έξι καλά χαρακτηρισμένα πάνελ δειγμάτων γονιδιωματικού DNA από κλινικά δείγματα FFPE ή κυτταρικές σειρές. Κάθε πάνελ αποτελούνταν από 10 μέλη, για συνολικά 60 μέλη σε όλα τα πάνελ.

Τα 60 μέλη του πάνελ αποτελούνταν από διπλότυπα τεσσάρων δειγμάτων μοναδικού άγριου τύπου (για μεταλλάξεις στο πάνελ), 12 μοναδικά μεταλλαγμένα δείγματα (με μία μόνο μετάλλαξη) που παρασκευάστηκαν τόσο σε υψηλά όσο και σε χαμηλά επίπεδα συχνότητας μετάλλαξης και δύο μοναδικά μεταλλαγμένα δείγματα (με μία μόνο μετάλλαξη) που παρασκευάστηκαν μόνο σε χαμηλό επίπεδο συχνότητας μετάλλαξης. Κάθε μοναδικό δείγμα σε επίπεδο συχνότητας μετάλλαξης δείγματος (εξετάστηκε εις διπλούν σε κάθε εκτέλεση) είχε 36 πιθανά αποτελέσματα (2 αντίγραφα \times 2 τελεστές \times 3 ημέρες \times 3 εργαστήρια) εάν όλα τα αποτελέσματα ήταν έγκυρα.

Το ποσοστό αναμενόμενης αντιστοίχισης (PEC) σε όλες τις θετικές και αρνητικές παραλλαγές αξιολογήθηκε συγκρίνοντας το αποτέλεσμα του αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού με το αναμενόμενο αποτέλεσμα μετάλλαξης (αναμενόμενη μετάλλαξη που ανιχνεύτηκε ή δεν ανιχνεύτηκε) σε κάθε δείγμα. Το PEC υπολογίζεται ως 100% επί του αριθμού των αναμενόμενων αντιστοιχίσεων διαιρούμενο με τον αριθμό των αντιστοιχίσεων που επιχειρήθηκαν. Τα αμφίπλευρα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βαθμολογίας Wilson.

Στα συνδυαστικά εργαστηριακά αποτελέσματα, τα ποσοστά επιτυχίας δείγματος ήταν $\geq 94,7\%$ για την πρώτη εκτέλεση του δείγματος ή σε δείγματα που εξετάστηκαν σε εκτελέσεις που ήταν έγκυρες την πρώτη φορά. Η PEC επιπέδου μετάλλαξης σε όλα τα μεταλλαγμένα δείγματα ήταν $99,6\%$ (905/909) (ΔΕ 95%, 98,9, 99,8). Ο αριθμός των επιχειρούμενων αντιστοιχίσεων και στις 56 μεταλλάξεις του πάνελ (ανεξάρτητα από το αν αναμενόταν ή όχι μια ανιχνευμένη μετάλλαξη) για όλα τα έγκυρα δείγματα ήταν 58.856 (56 × 1051). Από αυτές τις 58.856 παρατηρήσεις επιπέδου μετάλλαξης, υπήρξαν μόνο έξι περιστατικά όπου τα παρατηρούμενα και τα αναμενόμενα αποτελέσματα ήταν ασύμφωνα. Η PEC επιπέδου μετάλλαξης σε όλες τις θετικές και αρνητικές παραλλαγές από όλα τα μεταλλαγμένα μέλη και αυτά άγριου τύπου των πάνελ συνδυαστικά ήταν $99,99\%$ (58.850/58.856).

Ευαισθησία της ανάλυσης (Όριο τυφλού [LoB] και όριο ανίχνευσης [LoD])

Αυτή η μελέτη επαλήθευσε την οριακή τιμή προσδιορισμού και καθόρισε το όριο ανίχνευσης (LoD) για το MiSeqDx με ένα αντιπροσωπευτικό πάνελ. Εν συντομία, οι καλά χαρακτηρισμένες κυτταρικές σειρές Platinum Genome GM12878 και GM12877 ήταν μονιμοποιημένες σε φορμαλίνη και εγκλεισμένες σε παραφίνη και στη συνέχεια εκχυλίστηκε το DNA. Το GM12878 αραιώθηκε με GM12877, έτσι ώστε οι συχνότητες παραλλαγής 70 παραλλαγών (52 SNV, εννέα εισαγωγές και εννέα διαγραφές) ήταν περίπου 0,05. Τα δύο δείγματα DNA εξετάστηκαν από δύο χειριστές, χρησιμοποιώντας δύο όργανα και δύο παρτίδες αντιδραστηρίων, για συνολικά 10 κύκλους εκτελέσεων αλληλούχισης με το MiSeqDx. Αυτό επέφερε 40 αντίγραφα για κάθε παραλλαγή GM12878 και 60 αντίγραφα για κάθε αντίστοιχη συντεταγμένη άγριου τύπου στο GM12877 για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων. Οι τιμές LoB και LoD υπολογίστηκαν με την κλασική προσέγγιση που αναφέρεται στο CLSI EP17-A2 με τη μη παραμετρική επιλογή. Οι τιμές LoB και LoD υπολογίστηκαν ξεχωριστά για SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω ομαδοποίησης των συχνοτήτων παραλλαγής για έναν συγκεκριμένο τύπο παραλλαγής. Το σφάλμα Τύπου I ορίστηκε ως 0,01 και το σφάλμα τύπου II ορίστηκε ως 0,05.

Για την ομαδοποίηση LoB, οι ομαδοποιημένες συχνότητες παραλλαγής ταξινομήθηκαν από την κατώτερη στην ανώτερη, και υπολογίστηκε η 99η θέση για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων για κάθε τύπο παραλλαγής (Πίνακας 20). Το λογισμικό MiSeqDx χρησιμοποιεί τιμή αποκοπής (το ωφέλιμο LoB) 0,026 συχνότητας παραλλαγής για τον καθορισμό της ποσοτικής ανίχνευσης παραλλαγών. Τα υπολογισμένα όρια τυφλού επαλήθευσαν ότι αυτή η τιμή αποκοπής έχει ως αποτέλεσμα ένα σφάλμα τύπου I που δεν υπερβαίνει το 0,01.

Πίνακας 20 Όριο τυφλού

Τύπος παραλλαγής	Συνολικός αριθμός συχνοτήτων διακύμανσης	LoB για παρτίδα αντιδραστηρίων 1 (%)	LoB για παρτίδα αντιδραστηρίων 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Προσθήκη	540	0,79	0,60
Διαγραφή	540	0,96	0,84

Για την τιμή LoD, υπολογίστηκε το ποσοστό των μεμονωμένων συχνοτήτων μεταλλάξεων για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων για κάθε τύπο παραλλαγής που είναι μικρότερο από την τιμή αποκοπής 0,026 (Πίνακας 21). Επειδή τα ποσοστά ήταν χαμηλότερα από το σφάλμα τύπου II 5% (0,05), η διάμεσος των συνδυασμένων συχνοτήτων παραλλαγής υπολογίστηκε ως τιμή LoD (Πίνακας 21). Η τιμή LoD για κάθε τύπο παραλλαγής θεωρήθηκε η μεγαλύτερη των δύο τιμών που υπολογίστηκαν για τις δύο παρτίδες αντιδραστηρίων: 5,45% για SNV, 4,88% για εισαγωγές και 5,44% για διαγραφές.

Πίνακας 21 Όριο ανίχνευσης

Παρτίδα αντιδραστηρίων	Τύπος παραλλαγής	Συνολικός αριθμός συχνοτήτων διακύμανσης	Αρ. VF μετρήσεων < 2,6%	% VF μετρήσεων < 2,6%	Όριο ανίχνευσης (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Προσθήκη	360	0	0,00	4,86
	Διαγραφή	360	2	0.60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Προσθήκη	360	0	0,00	4,88
	Διαγραφή	360	0	0,00	5,24

Οι παρακάτω μελέτες καταδεικνύουν τα χαρακτηριστικά απόδοσης του MiSeqDx με έναν άλλο αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό που στοχεύει σε 56 μεταλλάξεις σε δύο κλινικά σχετικά καρκινικά γονίδια (πάνελ μετάλλαξης). Το πάνελ μετάλλαξης έχει σχεδιαστεί για την ειδική ανίχνευση 56 μεταλλάξεων σε δύο κλινικά σχετικά καρκινικά γονίδια (Γονίδιο 1 και Γονίδιο 2). Ο προσδιορισμός προσδιορίζει ταυτόχρονα την παρουσία ή την απουσία καθεμίας από τις 56 μεταλλάξεις σε κάθε δείγμα που υποβάλλεται σε αλληλούχιση. Η μέθοδος αναφοράς για αυτές τις μελέτες ήταν η αμφίδρομη αλληλούχιση Sanger.

Επαναληψιμότητα από παρτίδα σε παρτίδα

Διεξήχθη μια μελέτη επαναληψιμότητας από παρτίδα σε παρτίδα για την αξιολόγηση της απόδοσης του οργάνου MiSeqDx σε όλες τις παρτίδες παρασκευασμένων κιτ αντιδραστηρίων (που περιελάμβανε την πιστοποίηση των δειγμάτων, προετοιμασία της βιβλιοθήκης και τα αντιδραστήρια αλληλούχισης) με τη χρήση του προσδιορισμού δύο αντιπροσωπευτικών γονιδίων και μιας ομάδας πέντε αναμειγμένων δειγμάτων FFPE που πληρούσαν τις απαιτήσεις πιστοποίησης των δειγμάτων. Κάθε δείγμα FFPE περιείχε δύο μοναδικές μεταλλάξεις: μία σε χαμηλότερο (περίπου 8%) επίπεδο συχνότητας μετάλλαξης και μία σε υψηλό (περίπου 14%) επίπεδο συχνότητας μετάλλαξης. Συλλέχθηκαν δώδεκα (12) παρατηρήσεις για καθένα από τα πέντε μείγματα δειγμάτων σε τρεις μη διαδοχικές ημέρες με τρεις παρτίδες κιτ αντιδραστηρίων. Ο συνολικός αριθμός παρατηρήσεων για τη μελέτη σε όλες τις παρτίδες

αντιδραστηρίων ήταν 180 παρατηρήσεις σε όλα τα μείγματα δειγμάτων και 360 παρατηρήσεις σε όλα τα επίπεδα συχνότητας μεταλλάξεων. Σε όλες τις παρτίδες και ημέρες, το 99,7% (359/360) των παρατηρήσεων έδειξε το αναμενόμενο αποτέλεσμα μετάλλαξης. Μία μετάλλαξη χαμηλής συχνότητας αντιστοιχίστηκε εσφαλμένα ως άγριου τύπου. Πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης για καθεμία από τις μεταλλάξεις/τα επίπεδα συχνότητας μεταλλάξεων, προκειμένου να εκτιμηθεί η μεταβλητότητα του συστήματος. Η συνολική τυπική απόκλιση κυμάνθηκε από 0,011 έως 0,029. Το στοιχείο της παρτίδας αντιδραστηρίων της συνολικής τυπικής απόκλισης κυμάνθηκε από 0 έως 0,015.

Ιστορικό αναθεώρησης

Αρ. εγγράφου	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 200006218 έκδ. 02	Οκτώβριος 2023	Ενημερώθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές στο Local Run Manager για την έκδοση 4. Ενημερώθηκε η επισήμανση, για να προστεθούν λεπτομέρειες για τον χορηγό στην Αυστραλία. Διορθώθηκαν ασυμφωνίες όπου το ένθετο συσκευασίας διαφέρει από την αναφορά μελέτης επαλήθευσης οργάνου για το MiSeqDx.
Αρ. εγγράφου 200006218 έκδ. 01	Μάιος 2022	Προστέθηκε το ένθετο συσκευασίας CN του MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro στον παρεχόμενο εξοπλισμό και υλικά. Δεν απαιτείται. Προστέθηκαν πληροφορίες εξέτασης για το MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro στα χαρακτηριστικά απόδοσης. Αφαιρέθηκε η ειδική για τις Η.Π.Α. σημείωση προσοχής από τις Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις.
Αρ. εγγράφου 200006218 έκδ. 00	Νοέμβριος 2021	Αρχική έκδοση για υποστήριξη των MOS έκδ. 4.0 και Local Run Manager έκδ. 3.0.

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του (-ων) προϊόντος (-ων) που περιγράφονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλής χρήση του (-ων) προϊόντος (-ων) που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του (-ων) εν λόγω προϊόντος (-ων).

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ), ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ).

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ(-ΩΝ) ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ(-ΩΝ) ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ(-ΟΥΣ) Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

© 2023 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα σήματα κατατεθέντα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα σήματα κατατεθέντα, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.illumina.com/company/legal.html.

Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 Η.Π.Α.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Χορηγός στην Αυστραλία

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

Επισήμανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά στα σύμβολα που μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων για το κιτ σας στη διεύθυνση support.illumina.com, στην καρτέλα *Documentation* (Τεκμηρίωση).