

Ulotka dołączona do opakowania aparatów z oprogramowaniem MOS w wer. 4

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO. WYŁĄCZNIE NA EKSPORT.

Przeznaczenie

Aparat MiSeqDx jest przeznaczony do ukierunkowanego sekwencjonowania bibliotek DNA z ludzkiego genomowego DNA wyodrębnianego z obwodowej krwi pełnej lub z tkanki utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) z wykorzystaniem oznaczeń diagnostycznych *in vitro* (IVD) przeznaczonych do wykonywania na tym aparacie. Aparat MiSeqDx nie jest przeznaczony do sekwencjonowania genomu pełnego ani sekwencjonowania *de novo*. Aparat MiSeqDx jest przeznaczony do stosowania z zarejestrowanymi i uwzględnionymi w wykazach, dozwolonymi lub zatwierdzonymi do stosowania w IVD odczynnikami i oprogramowaniem analitycznym.

Zasada procedury

Aparat Illumina MiSeqDx jest przeznaczony do celowanego resekwencjonowania ludzkiego DNA z użyciem materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania firmy Illumina bibliotek ludzkiego genomowego DNA wyodrębnionego z obwodowej krwi pełnej lub tkanek FFPE przy użyciu odczynników wymienionych w wykazach, dozwolonych lub zatwierdzonych do stosowania w diagnostyce *in vitro*. Biblioteki przygotowuje się poprzez amplifikację sekwencji docelowych oraz dodanie indeksów próbek i sekwencji przechwytywania. Biblioteki próbek są przechwytywane w komorze przepływowej i sekwencjonowane w aparacie przy użyciu technologii sekwencjonowania przez syntezę SBS. W technologii SBS stosowana jest metoda terminatora odwracalnego, służąca do wykrywania nukleotydów w miarę ich wiązania w rosnących łańcuchach DNA. Oprogramowanie Real-Time Analysis (RTA) wykonuje analizę obrazów i rozpoznawanie nukleotydów oraz w każdym cyklu sekwencjonowania przypisuje wynik jakościowy do każdego nukleotydu. Po zakończeniu analizy pierwotnej w aparacie MiSeqDx odbywa się przetwarzanie rozpoznań nukleotydów w analizie wtórnej. Proces przetwarzania obejmuje demultipleksowanie, tworzenie plików FASTQ, dopasowywanie, rozpoznawanie wariantów oraz tworzenie plików rozpoznawania wariantów (VCF, Variant Call Format), które zawierają informacje o wariantach obecnych na określonych pozycjach w genomie referencyjnym. Wtórna analiza w aparacie MiSeqDx wykonywana jest przy użyciu różnych modułów, w zależności od procedury.

Konfiguracja z obsługą dwóch systemów operacyjnych

Konfiguracja z obsługą dwóch systemów operacyjnych obejmuje osprzęt, oprogramowanie i procedury instalacyjne umożliwiające aparatowi MiSeqDx wykonywanie zarówno przebiegów sekwencjonowania diagnostycznego *in vitro* (IVD), jak i sekwencjonowania wyłącznie do celów badawczych (RUO, ang. Research Use Only). Konfiguracja z obsługą dwóch systemów operacyjnych umożliwi użytkownikowi przełączanie aparatu między trybem diagnostycznym a trybem badawczym. Znaczniki do identyfikacji radiowej (RFID, radio-

frequency identification) na materiałach eksploatacyjnych wykorzystywanych w sekwencjonowaniu zapobiegają użyciu odczynników do sekwencjonowania RUO w przebiegach sekwencjonowania diagnostycznego.

Ograniczenia dotyczące procedury

- Do celów diagnostyki *in vitro*.
- Wyniki przedstawione w ulotce uzyskano przy użyciu paneli reprezentatywnych oznaczeń z wykorzystaniem obwodowej krwi pełnej lub linii komórkowych w przypadku oznaczania wariantów linii zarodkowych oraz tkanki FFPE lub linii komórkowych FFPE w przypadku oznaczania wariantów somatycznych przy użyciu opisanych odczynników i modułów oprogramowania. Moduł analizy wariantów linii zarodkowej oraz moduł analizy wariantów somatycznych opracowano do oceny skuteczności oznaczeń reprezentatywnych. Cechy wydajności podano wyłącznie w celach informacyjnych. Przedstawione badania walidacyjne służą jedynie jako przykładowa ilustracja ogólnych możliwości aparatu i nie stanowią o możliwości użycia lub odpowiedniości aparatu w odniesieniu do jakichkolwiek szczególnych zastosowań. Wszystkie testy diagnostyczne opracowane z udziałem niniejszego aparatu wymagają pełnej walidacji we wszystkich aspektach działania.
- Produkt ma następujące ograniczenia:
 - Dane wyjściowe sekwencjonowania ≥ 5 Gb przy długości odczytu 2×150 bp.
 - Odczyty przechodzące przez filtr ≥ 15 milionów przy długości odczytu 2×150 bp.
 - Nukleotydy rozpoznawane z dokładnością wyższą niż $Q30 \geq 80\%$ przy długości odczytu 2×150 bp. 80% lub więcej nukleotydów ma wynik jakościowy w skali Phred powyżej 30, co oznacza rozpoznawanie nukleotydów z dokładnością powyżej 99,9%.
- Aparat MiSeqDx został zwalidowany jedynie do celów sekwencjonowania bibliotek ludzkiego DNA wyodrębnionego z obwodowej krwi pełnej lub tkanek FFPE. W oznaczeniach diagnostycznych *in vitro* z użyciem aparatu nie należy stosować bibliotek wygenerowanych z innych rodzajów próbek. Nie zbadano przydatności urządzenia w sekwencjonowaniu kwasów nukleinowych bakterii lub wirusów w preparatach klinicznych.
- Aparat MiSeqDx jest przeznaczony do zastosowań diagnostycznych *in vitro* z zarejestrowanymi i uwzględnionymi w wykazach, dozwolonymi lub zatwierdzonymi do stosowania w IVD odczynnikami lub oznaczeniami. Ograniczenia w zakresie odczynników i cechy wydajności opisane w niniejszej ulotce do opakowania są oparte na oznaczeniach reprezentatywnych i modułach oprogramowania. Informacje na temat przeznaczenia oznaczeń IVD, wykrywanych przez nie wariantów i rodzajów próbek można znaleźć w ulotce do opakowania właściwej dla danego oznaczenia.
- Oprogramowanie oznaczenia nie dopasowuje polimorfizmów typu indel (insercje, delecje i ich kombinacje) dłuższych niż 25 bp. W rezultacie oprogramowanie do oznaczeń nie wykrywa polimorfizmów typu indel o długości większej niż 25 bp.

w wer. 4

- System został zwalidowany do wykrywania wariantów pojedynczych nukleotydów (SNV, Single Nucleotide Variant) i delecji o długości do 25 bp oraz insercji o długości 24 bp w przypadku stosowania z oprogramowaniem do wykrywania wariantów linii zarodkowej lub wariantów somatycznych. W przypadku rozpoznawania wariantów somatycznych przy częstości wariantów wynoszącej 0,05 wykryto delecje o długości 25 bp oraz insercje o długości 18 bp.
- Oprogramowanie do oznaczeń może nie dopasowywać odczytów amplikonów z ekstremalną zawartością wariantów, co prowadzi do zaraportowania regionu jako typu dzikiego. Taka ekstremalna zawartość obejmuje:
 - Odczyty zawierające ponad trzy polimorfizmy typu indel.
 - Odczyty o długości co najmniej 30 bp i zawartości SNV powyżej 4% całkowitej długości docelowego amplikonu (z wykluczeniem regionów sondy).
 - odczyty o długości poniżej 30 bp o zawartości SNV ponad 10% całkowitej długości amplikonu (z uwzględnieniem regionów sondy).
- Duże warianty, w tym warianty wielonukleotydowe (MNV, Multi-Nucleotide Variant) i duże polimorfizmy typu indel, mogą zostać zgłoszone jako odrębne mniejsze warianty w wyjściowym pliku VCF.
- Warianty delecji mogą być filtrowane lub pominięte w przypadku rozciągnięcia na dwa sąsiednie amplikony, jeśli długość delecji jest większa lub równa nałożeniu pomiędzy sąsiednimi amplikonami.
- System nie jest w stanie wykryć polimorfizmów typu indel, jeśli występują bezpośrednio obok startera i nie ma nakładającego się amplikonu. W przypadku regionów z nakładającymi się amplikonami oznaczenie nie pozwala wykryć delecji, kiedy region nałożenia jest mniejszy niż rozmiar wykrywanej delecji. Na przykład, jeśli region nałożenia pomiędzy dwoma sąsiednimi amplikonami obejmuje dwa nukleotydy, oznaczenie nie pozwala wykryć żadnych delecji obejmujących oba te nukleotydy. Delecja pojedynczego nukleotydu na dowolnym z tych nukleotydów może zostać wykryta.
- Podobnie jak w przypadku procedur przygotowania bibliotek opartych na hybrydyzacji odpowiednie polimorfizmy, mutacje, insercje lub delecje w regionach wiązań oligonukleotydów mogą mieć wpływ na badane allele. W rezultacie wpływ jest też wywierany na rozpoznania nukleotydów podczas sekwencjonowania. Na przykład:
 - Wariant w fazie z wariantem w regionie startera może nie ulec amplifikacji, dając wynik fałszywie ujemny.
 - Warianty w regionie startera mogą uniemożliwić amplifikację allelu referencyjnego, prowadząc do nieprawidłowego wykrycia wariantu homozygotycznego.
 - Warianty polimorfizmów typu indel w regionie startera mogą doprowadzić do fałszywie dodatniego rozpoznania pod koniec odczytu w sąsiedztwie startera.
- Polimorfizmy typu indel mogą zostać odfiltrowane ze względu na obciążenie systematyczne nici, jeśli występują w pobliżu końca odczytu i są poddawane procesowi soft-clippingu podczas dopasowania.
- Nie walidowano pod kątem małych polimorfizmów typu MNV.
- Nie walidowano pod kątem wariantów liczby kopii lub wariantów strukturalnych, takich jak fuzje czy translokacje.

w wer. 4

- Ograniczenia swoiste dla linii zarodkowej:
 - Aparat MiSeqDx wykorzystujący moduł do wykrywania wariantów linii zarodkowej jest przeznaczony do dostarczania wyników jakościowych na potrzeby rozpoznawania wariantów linii zarodkowej (czyli homozygotycznych, heterozygotycznych, typu dzikiego).
 - W przypadku stosowania z modułem do wykrywania wariantów linii zarodkowej, minimalne pokrycie na amplicon niezbędne do dokładnego rozpoznania wariantu wynosi 150x. Liczba próbek i łączna liczba celowanych nukleotydów wpływają na pokrycie. Zawartość GC i inna zawartość genomowa mogą wpływać na pokrycie.
 - Zmienność liczby kopii może wpływać na to, czy wariant zostanie rozpoznany jako homo- czy heterozygotyczny.
 - Warianty w pewnym powtarzalnym kontekście są wyfiltrowywane w plikach VCF. Filtr powtórzeń RMxN jest stosowany do filtrowania wariantów, jeśli całość lub część sekwencji wariantu występuje powtarzalnie w genomie referencyjnym sąsiadującym z pozycją wariantu. W przypadku rozpoznawania wariantów linii zarodkowej do wyfiltrowania wariantu potrzeba co najmniej 9 powtórzeń w regionie referencyjnym, przy czym uwzględniane są tylko powtórzenia o długości do 5 bp (R5x9).
- Ograniczenia swoiste dla wariantów somatycznych:
 - Aparat MiSeqDx wykorzystujący moduł oznaczania wariantów somatycznych jest przeznaczony do dostarczania wyników jakościowych na potrzeby rozpoznawania wariantów somatycznych (np. obecność wariantu somatycznego o częstości wariantu większej lub równej 0,026 przy granicy wykrywalności wynoszącej 0,05).
 - W przypadku stosowania z modułem do wykrywania wariantów somatycznych minimalne pokrycie na amplicon niezbędne do dokładnego rozpoznania wariantu wynosi 450x na pulę oligonukleotydów. Liczba próbek i łączna liczba celowanych nukleotydów wpływają na pokrycie. Zawartość GC i inna zawartość genomowa mogą wpływać na pokrycie.
 - Warianty w pewnym powtarzalnym kontekście są wyfiltrowywane w plikach VCF. Filtr powtórzeń RMxN jest stosowany do filtrowania wariantów, jeśli całość lub część sekwencji wariantu występuje powtarzalnie w genomie referencyjnym sąsiadującym z pozycją wariantu. W przypadku rozpoznawania wariantów somatycznych potrzeba co najmniej 6 powtórzeń w regionie referencyjnym do wyfiltrowania wariantu, przy czym uwzględniane są tylko powtórzenia o długości do 3 bp (R3x6).
 - Moduł do wykrywania wariantów somatycznych nie jest w stanie odróżnić wariantów linii zarodkowej od wariantów somatycznych. Moduł jest przeznaczony do wykrywania wariantów o różnych częstościach wariantu, jednak częstości wariantu nie można użyć do odróżnienia wariantów somatycznych od wariantów linii zarodkowej.
 - Obecność prawidłowej tkanki w próbce wpływa na wykrywanie wariantów. Zgłoszona granica wykrywalności jest oparta na częstości wariantu względem całkowitego DNA wyekstrahowanego z tkanki nowotworowej i prawidłowej.

Składniki produktu

Illumina MiSeqDx składa się z następujących elementów:

MiSeqDxAparat (Nr kat. DX-410-1001)

Do działania aparatu MiSeqDx i analizy danych wymagane są następujące składniki oprogramowania:

| Aplikacja | Funkcja | Opis |
|---|---------------------------------|--|
| Oprogramowanie MiSeq Operating Software (MOS) | Sterowanie działaniem aparatu | Aplikacja Oprogramowanie MOS zarządza działaniem aparatu podczas sekwencjonowania oraz generuje obrazy używane przez oprogramowanie Real-Time Analysis (RTA). Więcej informacji można znaleźć w sekcji <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Instrukcja obsługi aparatu MiSeqDx z oprogramowaniem MOS w ver. 4) (nr dokumentu: 200010452)</i> . |
| Real-Time Analysis (RTA) | Wykonywanie analizy podstawowej | Aplikacja RTA przetwarza obrazy wygenerowane przez oprogramowanie Oprogramowanie MOS dla poszczególnych płytek w cyklu sekwencjonowania na pliki rozpoznania nukleotydów stanowiących dane wejściowe modułów analitycznych oprogramowania Local Run Manager (lokalnego menedżera przebiegu). Aplikacja RTA nie udostępnia interfejsu użytkownika. |
| Lokalny menedżer przebiegu | Interfejs wyboru modułu | Oprogramowanie Lokalny menedżer przebiegu stanowi zintegrowane z aparatem rozwiązanie do zarządzania użytkownikami, wykonywania wtórnych analiz i monitorowania statusu. Więcej informacji można znaleźć w sekcji <i>Local Run Manager v4 Software Reference Guide for MiSeqDx (Instrukcja obsługi lokalnego menedżera przebiegu w ver. 4 na aparacie MiSeqDx) (nr dokumentu: 200046657)</i> . |

Przechowywanie i sposób postępowania

| Element | Specyfikacja |
|-------------|--|
| Temperatura | Transport i przechowywanie: Od -10°C do 40°C (od 14°F do 104°F) Warunki pracy: Od 19°C do 25°C (od 66°F do 77°F) |
| Wilgotność | Transport i przechowywanie: Wilgotność względna poniżej punktu rosy Warunki pracy: wilgotność względna 30–75% (bez kondensacji) |

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania

Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 (Nr kat. 20037124)

Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Nr kat. 20063860)

Materiały eksploatacyjne dostarczane przez użytkownika

Przed rozpoczęciem przebiegu należy się upewnić, że materiały eksploatacyjne dostarczane przez użytkownika są dostępne.

| Materiał eksploatacyjny | Przeznaczenie |
|---|---|
| Chusteczki nasączone 70% alkoholem izopropylowym lub 70% etanolem | Czyszczenie platformy komory przepływowej i szkła komory |
| Chusteczki laboratoryjne, niestrzępiące się | Czyszczenie platformy komory przepływowej |
| Papier do czyszczenia soczewek, 4 × 6 cali | Czyszczenie komory przepływowej |
| Tween 20 | Mycie aparatu |
| Plastikowe szczypcy z kwadratową końcówką (opcjonalnie) | Wyjmowanie komory przepływowej z pojemnika transportowego |
| Woda, jakość laboratoryjna | Mycie aparatu |

Wytyczne dotyczące wody laboratoryjnej

Do przeprowadzania procedur w aparacie zawsze należy używać wody o jakości laboratoryjnej lub wody dejonizowanej. Nie wolno używać wody wodociągowej.

Należy używać wyłącznie następujących rodzajów wody lub ich odpowiedników:

- Woda dejonizowana
- Illumina PW1
- Woda o rezystywności 18 megaomów (MΩ)
- Woda Milli-Q
- Woda Super-Q
- Woda do biologii molekularnej

Ostrzeżenia i środki ostrożności



OSTRZEŻENIE

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Wentylacja powinna być odpowiednia do obsługi materiałów niebezpiecznych zawartych w odczynnikach. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednio do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i pozbywać się ich zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

- Z wszystkimi próbkami krwi należy postępować tak, jak gdyby znana była ich zakaźność w zakresie ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV), ludzkiego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz innych patogenów przenoszonych z krwią (uniwersalne środki ostrożności).
- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości próbek.

- Należy przestrzegać rutynowych środków ostrożności w laboratorium. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas pracy z próbkami i odczynnikami zestawu należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu postępowania się próbkami i odczynnikami zestawu należy dokładnie umyć ręce.
- Przestrzeganie zasad wykonywania prac oraz higieny prac laboratoryjnych jest wymagane, aby chronić produkty reakcji PCR przed zanieczyszczeniem przez odczynniki, przyrządy lub próbki genomowego DNA. Zanieczyszczenie PCR może powodować niedokładne i niepewne wyniki.
- Aby zapobiegać zanieczyszczeniu produktów, należy upewnić się, że obszary procesu przed amplifikacją i po niej są wyposażone w specjalne przyrządy i materiały eksploatacyjne (np. pipety, końcówki do pipetowania, bloki grzejne, mieszadła wirowe i wirówki).
- W stosownych przypadkach parowanie próbek z indeksami musi dokładnie odpowiadać wydrukowanemu układowi płytki. Po wprowadzeniu do modułu Lokalny menedżer przebiegu automatycznie uzupełnia startery indeksujące powiązane z nazwami próbek. Przed rozpoczęciem przebiegu sekwencjonowania użytkownikowi zaleca się zweryfikowanie powiązań starterów indeksowych z próbkami. Niezgodności między rozkładem próbek a ich przypisaniem na płytce mogą powodować dodatnie rozpoznanie próbek i nieprawidłowe dane w raporcie wyników.
- Zdecydowanie zaleca się instalację dostarczonego przez użytkownika oprogramowania chroniącego komputer przed wirusami. W celu uzyskania instrukcji dotyczących instalacji należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika.
- MiSeqDx nie należy używać ze zdjętymi panelami. Obsługa aparatu ze zdjętymi panelami stwarza potencjalne ryzyko ekspozycji użytkownika na działanie napięcia sieciowego oraz napięć prądu stałego.
- Nie należy dotykać stolika w przedziale komory przepływowej. Znajdująca się w tym przedziale grzałka działa w zakresie temperatur od 22°C do 95°C i może spowodować oparzenia.
- Aparat waży około 57 kg (126 lb) i w przypadku upuszczenia lub nieprawidłowego obchodzenia się z nim może powodować poważne obrażenia.
- Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do firmy Illumina i właściwego organu państwa członkowskiego, w którym przebywa użytkownik i/lub pacjent.

Instrukcja użytkownika

Poniższe instrukcje użytkownika aparatu MiSeqDx wymagają zastosowania odczynników dostarczonych w zestawie odczynników Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3.

Utwórz przebieg z Lokalny menedżer przebiegu

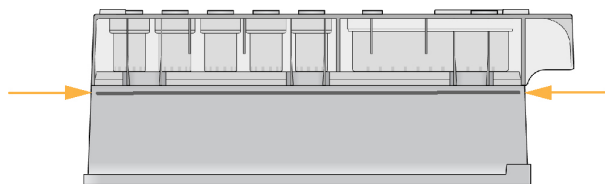
Szczegółowe instrukcje tworzenia przebiegu można znaleźć w *Local Run Manager v4 Software Reference Guide for MiSeqDx (Instrukcja obsługi lokalnego menedżera przebiegu w wer. 4 na aparacie MiSeqDx)* (nr dokumentu: 200046657) i podręczniku obsługi modułu Lokalny menedżer przebiegu dotyczącego stosowanego modułu analizy.

Przygotowywanie kasety odczynników

W poniższych instrukcjach opisano, jak rozmrozić odczynniki za pomocą kąpieli wodnej o temperaturze pokojowej.

1. Wyjąć kasetę odczynników z zamrażarki o temperaturze od -15°C do -25°C .
2. Umieścić kasetę odczynników w kąpieli z wodą dejonizowaną o temperaturze pokojowej, zanurzając dolną część kasety do nadrukowanej na niej linii poziomu wody. Należy uważać, aby nie przekroczyć linii maksymalnego poziomu wody.

Rysunek 1 Maksymalny poziom wody



3. Pozostawić kasetę odczynników do rozmrożenia w kąpieli wodnej o temperaturze pokojowej na około 60–90 minut lub do momentu całkowitego rozmrożenia.
4. Wyjąć kasetę z kąpieli wodnej i delikatnie postukać nią o blat w celu usunięcia wody z dolnej części kasety. Osuszyć dolną część kasety. Upewnić się, że wierzch kasety odczynników nie jest zachlapany wodą.

Sprawdzanie stanu kasety odczynników

1. Odwrócić dziesięciokrotnie kasetę odczynników w celu wymieszania rozmrożonych odczynników, a następnie sprawdzić, czy wszystkie pozycje zostały rozmrożone.
2. Sprawdzić odczynniki w pozycjach 1, 2 i 4, aby upewnić się, że zostały dokładnie wymieszane i nie zawierają osadów.

UWAGA W celu zapewnienia prawidłowego sekwencjonowania ważne jest, aby odczynniki w kasecie były dokładnie rozmrożone i wymieszane.

3. Delikatnie postukać kasetą o blat w celu zmniejszenia liczby pęcherzyków powietrza w odczynnikach.

UWAGA W dolnej części każdego zbiorniczka znajdują się rurki dozownika aparatu MiSeqDx służące do aspiracji odczynników, dlatego ważne, aby w zbiorniczkach nie było pęcherzyków powietrza.

4. Do czasu konfiguracji przebiegu umieścić kasetę odczynników w lodzie lub wstawić do lodówki o temperaturze od 2°C do 8°C (na maksymalnie sześć godzin). W celu uzyskania najlepszych rezultatów należy umieścić próbkę w aparacie i skonfigurować przebieg.

Przygotowanie próbek do sekwencjonowania

Wskazówki dotyczące przygotowywania bibliotek próbek do sekwencjonowania, w tym przygotowywania rozcieńczeń i pul bibliotek, można odszukać w ulotce do opakowania zestawu do przygotowywania bibliotek w sekcji „Instrukcja użytkownika”.

Rozcieńczenie bibliotek próbek zależy od złożoności pul oligonukleotydów. W aparacie MiSeqDx wymagana jest optymalizacja gęstości klastrów. Optymalna gęstość może się różnić w zależności od konkretnego zestawu do przygotowania bibliotek.

Ładowanie bibliotek próbek do kasety

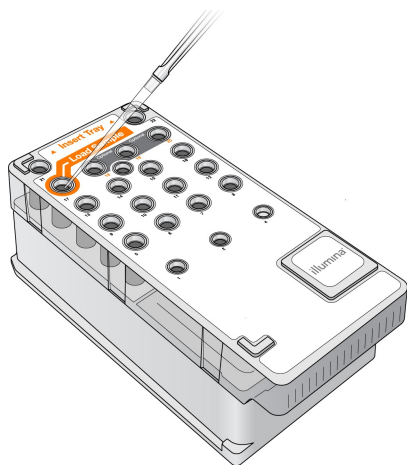
Próbki można załadować do kasety odczynników, gdy jest ona gotowa do użycia po całkowitym rozmrożeniu.

1. Za pomocą osobnej, czystszej i pustej 1 ml końcówki do pipety przedziurawić folię zabezpieczającą zbiorniczek kasety odczynników oznaczony **Load Samples** (Ładowanie próbek).

UWAGA Nie nakłuwać innych miejsc na kasecie odczynników. Inne miejsca na kasecie odczynników są przekłuwane automatycznie podczas przebiegu.

2. Wkroplić pipetą 600 µl przygotowanych bibliotek próbki z biblioteki amplikonów w rozcieńczeniu (DAL, diluted amplicon library) do zbiorniczka z oznaczeniem **Load Samples** (Ładowanie próbek). Nie dotykać foliowego zamknięcia.
3. Po załadowaniu próbki sprawdzić, czy w zbiorniczku nie ma pęcherzyków powietrza. Jeśli występują pęcherzyki, delikatnie stuknąć kasetą o blat w celu uwolnienia pęcherzyków.

Rysunek 2 Ładowanie bibliotek



4. Przejsz bezpośrednio do konfiguracji przebiegu za pomocą interfejsu oprogramowania Oprogramowanie MiSeq Operating Software (MOS).

Konfiguracja przebiegu

Pełne instrukcje konfiguracji przebiegu można znaleźć w: *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Instrukcja obsługi aparatu MiSeqDx z oprogramowaniem MOS w wer. 4) (nr dokumentu: 200010452)*.

1. Zalogować się do aparatu MiSeqDx przy użyciu lokalnego hasła do oprogramowania Lokalny menedżer przebiegu.
2. Na ekranie głównym oprogramowania MOS wybrać **Sequence** (Sekwencjonowanie).
3. Wybrać przebieg z listy, a następnie nacisnąć **Next** (Dalej).
Seria ekranów konfiguracji przebiegu otwiera się w następującej kolejności: Ładowanie komory przepływowej, ładowanie odczynników, przegląd i kontrola przed uruchomieniem.
4. Po wyświetleniu ekranu Load Flow Cell (Ładowanie komory przepływowej) wyczyścić, a następnie załadować komorę przepływową.
5. Zamknąć zatrzask i drzwiczki przedziału komory przepływowej.
Przed rozpoczęciem przebiegu zarówno zatrzask, jak i drzwiczki przedziału powinny być zamknięte. Gdy komora przepływowa zostanie załadowana, oprogramowanie odczytuje i rejestruje znacznik RFID. W prawym dolnym rogu ekranu zostaje wyświetlone potwierdzenie pomyślnego odczytu znacznika RFID.
6. Aby załadować butelkę z roztworem MiSeqDx SBS (PR2), postępować zgodnie z monitami oprogramowania. Upewnić się, że butelka na zlewki jest pusta i załadować kasetę odczynników.
Po załadowaniu butelki z roztworem MiSeqDx SBS (PR2) i kasety odczynników oprogramowanie odczytuje i rejestruje znacznik RFID. W prawym dolnym rogu ekranu zostaje wyświetlone potwierdzenie pomyślnego odczytu znacznika RFID.
7. Po rozpoczęciu przebiegu otwiera się ekran Sequencing (Sekwencjonowanie). Ten ekran w sposób wizualny przedstawia trwający przebieg, w tym poziomy intensywności i wyniki jakościowe.

Wyniki

Real-Time Analysis (RTA) jest zintegrowanym oprogramowaniem, które wykonuje analizę obrazów i rozpoznawanie nukleotydów, a także przypisuje wyniki jakościowe do poszczególnych nukleotydów w każdym cyklu sekwencjonowania. Po zakończeniu analizy podstawowej wybrany w aparacie MiSeqDx moduł oprogramowania opisany w sekcji [Utwórz przebieg z Lokalny menedżer przebiegu na stronie 7](#) rozpoczyna analizę wtórną. Inne procedury opisano w dokumentacji konkretnego oznaczenia.

Procedury kontroli jakości

Oprogramowanie MiSeqDx ocenia każdy przebieg, próbkę i rozpoznanie nukleotydu w oparciu o miary kontroli jakości. Gdy jest to wymagane, ocenie pod kątem oczekiwanych wyników należy również poddać dodatnie i ujemne próby kontrolne uwzględnione w przygotowaniu biblioteki.

Charakterystyka wydajności

Wszystkie badania wykonywano na aparacie MiSeqDx.

W badaniach linii zarodkowych do przygotowania bibliotek wykorzystywano odczynniki z testu MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy albo z zestawu do sekwencjonowania niestandardowych amplikonów TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. W obu zestawach wykorzystywane są te same odczynniki do przygotowywania bibliotek, z jedynie jedną różnicą na poziomie proceduralnym dotyczącą liczby cykli łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (odpowiednio 25 i 28). Jak wykazano w badaniu poziomów wejściowych DNA z wykorzystaniem zestawu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, dzięki dodatkowym cyklom reakcji PCR w przypadku zestawu do sekwencjonowania niestandardowych amplikonów TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) dopuszczalny jest niższy poziom wejściowy DNA niż w teście MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng) do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy. Biblioteki sporządzone z wykorzystaniem testu MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy sekwencjonowano odczynnikami wchodzącymi w skład zestawu. Biblioteki sporządzone z wykorzystaniem zestawu do sekwencjonowania niestandardowych amplikonów TruSeq Custom Amplicon Kit Dx sekwencjonowano odczynnikami z zestawu Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3. Odczynniki sekwencjonujące użyte w tym drugim przypadku charakteryzują się wyższym poziomem wyjściowym w porównaniu z odczynnikami stosowanymi w teście MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy.

Testy obejmują zakresy przepustowości dla próbek obsługiwane przy użyciu zestawu Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Aparat MiSeqDx może obsłużyć 1–96 próbek/przebieg, w zależności od oznaczenia. Zestaw odczynników Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro został opracowany w celu obsługi niższej przepustowości dla próbek w wybranych oznaczeniach.

W badaniach wariantów somatycznych wykorzystywano zestaw do sekwencjonowania niestandardowych amplikonów TruSeq Custom Amplicon Kit Dx z zestawem odczynników Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3.

Po procedurach właściwych dla linii zarodkowych lub wariantów somatycznych opisanych dla zestawu do sekwencjonowania niestandardowych amplikonów TruSeq Custom Amplicon Kit Dx następowała analiza z wykorzystaniem odpowiednio modułu wariantów linii zarodkowych lub modułu wariantów somatycznych z dwoma wyjątkami. W badaniach z wykorzystaniem jednego genu (procedura linii zarodkowej, test MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu mukowiscydozy) lub dwóch genów (procedura somatyczna) wykorzystywano procedury i moduły analityczne właściwe dla oznaczenia.

UWAGA Zawartość genomową amplikonów opisano względem sekwencjonowanej nici genomu. W przypadku amplikonów zaprojektowanych dla nici antysensownej referencyjna zawartość genomowa jest odwrotnie komplementarna (np. regiony PolyA na amplikonach nici antysensownej odpowiadają regionom polyT w genomie referencyjnym).

Definicje obliczeń stosowanych w określaniu parametrów użytkowych

- Procentową zgodność wyników dodatnich (PPA, ang. Positive Percent Agreement) oblicza się jako odsetek prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu loci sklasyfikowanych jako warianty w oparciu o metodę referencyjną.
 - $(\text{liczba loci wariantowych prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) / (\text{całkowita liczba loci wariantowych})$
Loci wariantowe zgłoszone w oznaczeniu i zgodne z metodą referencyjną stanowią wyniki prawdziwie dodatnie (TP). Loci wariantowe zgłoszone w oznaczeniu jako rozpoznania sekwencji referencyjnej lub jako inne rozpoznania wariantowe stanowią wyniki fałszywie ujemne (FN, ang. False Negative).
- Procentową zgodność wyników ujemnych (NPA, ang. Negative Percent Agreement) oblicza się jako odsetek loci sklasyfikowanych metodą referencyjną jako typ dziki i prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu.
 - $(\text{liczba loci typu dzikiego prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) / (\text{całkowita liczba loci typu dzikiego})$
Loci typu dzikiego zgłoszone przez oznaczenie i zgodne z metodą referencyjną stanowią wyniki prawdziwie ujemne (TN). Loci typu dzikiego zgłoszone w oznaczeniu jako warianty stanowią wyniki fałszywie dodatnie (FP, ang. False Positive).
- Ogólną zgodność procentową (OPA) oblicza się jako odsetek loci prawidłowo sklasyfikowanych w oznaczeniu w stosunku do metody referencyjnej.
 - $((\text{liczba loci wariantowych prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) + (\text{liczba loci typu dzikiego prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu})) / ((\text{całkowita liczba loci wariantowych}) + (\text{całkowita liczba loci typu dzikiego}))$
- W przypadku rozpoznawania wariantów obliczenia parametrów PPA, NPA i OPA nie obejmują braków rozpoznań (loci wariantowych lub referencyjnych niespełniających warunków jednego lub większej liczby filtrów jakościowych). W dwóch badaniach w mierze „Odsetek prawidłowych rozpoznań” uwzględniono brak rozpoznań, co zostało zaznaczone przy stosownych tabelach.
- Odsetek rozpoznań oblicza się jako całkowitą liczbę loci, które przeszły przez filtry, podzieloną przez całkowitą liczbę pozycji zsekwencjonowanych dla chromosomów 1–22. Chromosomy X i Y nie są uwzględniane. Metryka ta nie uwzględnia zgodności rozpoznań z metodą referencyjną.

Informacje na temat cech wydajności zależnych od czynników przedanalitycznych (np. sposobów ekstrakcji lub wprowadzania DNA) można odszukać w ulotce dołączonej do opakowania odpowiedniej metody przygotowywania bibliotek.

Indeksowanie próbek

Dodawane podczas przygotowywania biblioteki startery indeksujące próbki służą do przypisywania unikalnych sekwencji do poszczególnych próbek DNA, co umożliwi pulowanie wielu próbek w pojedynczym przebiegu sekwencjonowania. Indeksowanie próbek przebadano w procedurach dotyczących linii zarodkowych i somatycznych.

w wer. 4

Przebadano łącznie 96 indeksów próbek przy użyciu oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania szeregu genów wchodzących w skład wszystkich 23 ludzkich chromosomów i zawierających po 12 588 nukleotydów na łańcuch w celu weryfikacji stałej zdolności do rozpoznawania genotypu w określonej próbce z zastosowaniem różnych kombinacji starterów indeksujących. Chromosom Y nie zawiera regionów o wysokiej ufności i nie został poddany badaniu. Osiem unikalnych próbek zostało przebadanych przy użyciu 12 różnych kombinacji starterów indeksujących. Wyniki dla próbek uzyskane przy użyciu modułu analizy linii zarodkowych porównano do bazy Platinum Genomes w wersji 2016-01. Parametr PPA (dla SNV i polimorfizmów typu indel) przekroczył 97% (faktycznie dodatnie rozpoznania wynosiły co najmniej 70 dla SNV, 38 dla insercji, 36 dla delecji), zaś parametr NPA wyniósł 100% (co najmniej 23 440 pozycji referencyjnych na kombinację indeksów) dla każdej z 96 kombinacji indeksów. Niezależnie od powyższego przeprowadzono badanie pojedynczego indeksu w celu stwierdzenia, że chemiczny mechanizm sekwencjonowania zestawu odczynników Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 jest w stanie obsłużyć mniej niż osiem próbek (mechanizm chemiczny wcześniejszego zestawu uniwersalnego MiSeqDx Universal Kit 1.0 był ograniczony do oznaczania co najmniej ośmiu próbek). Dla pojedynczego indeksu wyznaczono wartości PPA wynoszące 98,9% (180/182) dla SNV, 100% (38/38) dla insercji i 100% (46/46) dla delecji. NPA wyniósł 100% (23 856/23 856).

W celu zmierzenia dokładności indeksowej dla wariantów somatycznych występujących z częstościami z zakresu 0,05–0,10 przy użyciu modułu do oznaczeń wariantów somatycznych przetestowano dwanaście powtórzeń (24 biblioteki) próbki (do rozpoznania w liniach somatycznych wykorzystuje się kombinacje dwóch indeksów w każdym powtórzeniu). PPA wyniósł 100% dla SNV (64/64), insercji (11/11) i delecji (19/19). NPA wyniósł 100% (co najmniej 11 590 pozycji referencyjnych na każdą kombinację indeksów) dla wszystkich kombinacji indeksów.

Przenoszenie próbek

Procedura oznaczeń przy użyciu aparatu MiSeqDx obejmuje przygotowanie biblioteki i sekwencjonowanie wielu próbek i kontroli, które są wszystkie przetwarzane jednocześnie. Przeprowadzono badanie przeniesienia próbki mające na celu stwierdzenie, czy wyniki fałszywie dodatnie, powstałe na skutek przeniesienia zanieczyszczenia z sąsiedniego dołka na etapie przygotowania biblioteki lub przeniesienia zanieczyszczenia między kolejnymi przebiegami, mają wpływ na wyniki oznaczeń. Do tego celu użyto wariantów somatycznych, jako że ich wykrywanie możliwe jest przy niższych częstościach występowania w allelach niż ma to miejsce w przypadku wariantów linii zarodkowych.

Zestaw próbek obejmował cztery próbki genomowego DNA z linii komórkowych; każda próbka zawierała różne mutacje panelowe dwugenowego oznaczenia reprezentatywnego. Próbki były dobrane w taki sposób, by mutacja w danej pozycji w jednej z próbek posiadała punkt odniesienia właściwy dla sekwencji dzikiego typu w pozostałych próbkach.

Przeniesienie między dołkami określa się jako tryb błędu potencjalnie generowanego w ręcznych etapach przetwarzania (pipetowanie, przemieszanie próbek itp.). Ocena efektu przeniesienia między próbkami obejmowała przeprowadzenie dwóch przebiegów:

- Szachownicowy układ z wysokim poziomem wejściowym genomowego DNA (gDNA) zawierającego mutację w genie 1 naprzemiennie z niskim poziomem wejściowym gDNA zawierającego mutację w genie 2.

- Szachownicowy układ z wysokim poziomem wejściowym gDNA zawierającego mutację w genie 2 naprzemiennie z niskim poziomem wejściowym gDNA zawierającego mutację w genie 1.

W każdym z przebiegów dokonano oceny 12 powtórzeń pod kątem wyników fałszywie dodatnich (np. mutacja genu 1 zgłoszona dla dołka oznakowanego jako próbka z mutacją genu 2 lub odwrotnie).

Przeniesienie między przebiegami określa się jako tryb błędu potencjalnie generowanego przez pozostałość z poprzedniego przebiegu sekwencjonowania. W celu stwierdzenia ewentualnego przeniesienia między przebiegami przygotowano dwie płytki, z których każda zawierała 11 powtórzeń pojedynczej, unikalnej próbki gDNA o wysokim poziomie wejściowym oraz próbę ślepą; obie serie sekwencjonowano kolejno na jednym aparacie MiSeqDx, po czym dokonano oceny wyników fałszywie dodatnich. W pierwszym przebiegu sekwencjonowano 11 powtórzeń próbki z mutacją genu 2 i jedną próbę ślepą. W drugim przebiegu sekwencjonowano 11 powtórzeń próbki z mutacją genu 1 i jedną próbę ślepą. W pierwszej kolejności wykonano sekwencjonowanie biblioteki próbki z mutacją genu 2, po którym wykonano sekwencjonowanie biblioteki próbki z mutacją genu 1, a następnie ponowne sekwencjonowanie biblioteki próbki z mutacją genu 2.

Zaobserwowanie mutacji genu 2 w przebiegu obejmującym wyłącznie mutacje genu 1 lub odwrotnie wskazywałoby na zajście efektu przeniesienia.

Zgłoszono zero wyników fałszywie dodatnich (0/24, 0%) będących wynikiem przeniesienia *między dołkami*.

Wykryto wszystkie oczekiwane mutacje. Zgłoszono zero wyników fałszywie dodatnich (0/24, 0%) będących wynikiem przeniesienia *między przebiegami*. Wykryto wszystkie oczekiwane mutacje. Zgłoszono zero wyników fałszywie dodatnich (0/48, 0%) będących wynikiem przeniesienia *ogółem* (przeniesienia między dołkami i przeniesienia między przebiegami łącznie).

Cechy wydajności – linia zarodkowa

W opisywanych tu badaniach do analizy danych z sekwencjonowania wykorzystywano moduł do oznaczania wariantów zarodkowych, z wyjątkiem badań wykorzystujących panel jednogenowy, w których wykorzystywano moduł swoisty dla oznaczenia.

Dokładność

W celu oceny dokładności aparatu MiSeqDx z zestawem odczynników Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 i DNA o wysokiej jakości przeprowadzono opisane poniżej badanie. W tym badaniu użyto oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania różnych genów obejmujących 12 588 nukleotydów znajdujących się w 23 różnych chromosomach przy użyciu 150 amplikonów. Chromosom Y nie zawiera regionów o wysokiej ufności i nie został poddany badaniu. W badaniu użyto 12 unikalnych próbek pochodzących od dwojga rodziców i 10 dzieci, które to próbki wcześniej były często sekwencjonowane różnymi metodami przez wiele laboratoriów. Dostępnych jest pięć próbek pochodzących od osób płci żeńskiej oraz siedem próbek od osób płci męskiej. Każdą z próbek badano w dwóch powtórzeniach. Dokładność została określona dla wariantów SNV, insercji i delecji przez porównanie danych z badania z dobrze scharakteryzowaną referencyjną bazą danych. Sekwencję w referencyjnej bazie danych (Platinum Genomes wersja 2016-01) uzyskano w wyniku połączenia wielu metod sekwencjonowania, publicznie dostępnych danych oraz informacji o dziedziczeniu. O ile nie podano inaczej, regiony o wysokim poziomie ufności zostały zdefiniowane w oparciu o ww. metodę referencyjną. Łącznie próbki poddano przebiegowi osiem razy. Tabele mające ilustrować dokładność rozpoznań opierają się na danych z pierwszego przebiegu.

Tabela 1 zawiera dane z badania prezentowane w postaci procentowych zgodności wyników dodatnich i ujemnych dla poszczególnych próbek, przy czym na potrzeby obliczeń zgodności PPA wyniki wariantów są porównywane z dobrze scharakteryzowanymi, złożonymi danymi referencyjnymi. Trzy typy wariantów (SNV, insercje i delecje) zostały ze sobą połączone. Ponieważ metoda referencyjna dostarcza tylko wyniki dotyczące wariantów pojedynczych nukleotydów oraz insercji/delecji, wyniki nukleotydów niewariantowych na potrzeby obliczeń zgodności NPA porównywane są z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego.

Tabela 1 Zgodność wyników rozpoznawania nukleotydów przez aparat MiSeqDx w zależności od próbki

| Próbka | Średni odsetek rozpoznań | Całkowita liczba wariantów | Całkowita liczba wariantów TP | Całkowita liczba wariantów FN | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba rozpoznań TN | PPA | NPA | OPA |
|---------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|-----|-----|-----|
| NA12877 | > 99,9 | 152 | 152 | 0 | 4 | 24024 | 100 | 100 | 100 |
| NA12878 | > 99,9 | 270 | 266 | 0 | 4 | 23856 | 100 | 100 | 100 |

| Próbka | Średni odsetek rozpoznań | Całkowita liczba wariantów | Całkowita liczba wariantów TP | Całkowita liczba wariantów FN | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba rozpoznań TN | PPA | NPA | OPA |
|---------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|------|-----|--------|
| NA12879 | > 99,9 | 192 | 190 | 1 | 1 | 24054 | 99,5 | 100 | > 99,9 |
| NA12880 | > 99,9 | 222 | 220 | 0 | 6 | 24052 | 100 | 100 | 100 |
| NA12881 | > 99,9 | 250 | 247 | 1 | 2 | 23862 | 99,6 | 100 | > 99,9 |
| NA12882 | > 99,9 | 200 | 196 | 2 | 2 | 23962 | 99,0 | 100 | > 99,9 |
| NA12883 | > 99,9 | 226 | 224 | 0 | 6 | 23870 | 100 | 100 | 100 |
| NA12884 | > 99,9 | 228 | 226 | 1 | 1 | 23942 | 99,6 | 100 | > 99,9 |
| NA12885 | > 99,9 | 244 | 240 | 2 | 2 | 23942 | 99,2 | 100 | > 99,9 |
| NA12886 | > 99,9 | 230 | 228 | 1 | 1 | 23888 | 99,6 | 100 | > 99,9 |
| NA12888 | > 99,9 | 216 | 216 | 0 | 4 | 24002 | 100 | 100 | 100 |
| NA12893 | > 99,9 | 236 | 234 | 0 | 2 | 23810 | 100 | 100 | 100 |

Oznaczenie reprezentatywne składało się ze 150 amplikonów zaprojektowanych tak, by pokryć szeroki zakres zawartości materiału genetycznego. Zawartość GC w amplikonach mieściła się w zakresie 26–87%. Amplikony charakteryzowały się również pewnym zakresem powtórzeń pojedynczych nukleotydów (np. PolyA, PolyT), dinukleotydów i trinukleotydów. Uzyskane dane skompilowano w oparciu o poszczególne amplikony (Tabela 2) w celu oznaczenia wpływu zawartości materiału genetycznego na odsetek prawidłowych rozpoznań. Odsetek prawidłowych rozpoznań obejmuje rozpoznania wariantów i rozpoznania referencyjne i jest mniejszy niż 100% w przypadku wystąpienia nieprawidłowych rozpoznań lub braku rozpoznań. Warianty nie są rozpoznawane w przypadku niespełnienia warunków jednego lub większej liczby filtrów dla rozpoznania wariantu (np. niewystarczającego pokrycia).

Siedem spośród ośmiu wariantów FN w Tabela 2 obejmowało insercję 1 bp w amplikonie 111, zawierającym również homopolimer PoliA i mającym zawartość GC na poziomie 0,29. Ósmy wariant FN (nieprawidłowe rozpoznanie) był spowodowany rozpoznaniem jako wariantu homozygotycznego oczekiwanej heterozygotycznej SNV w amplikonie 125 o zawartości GC na poziomie 0,68. Częstość wariantu SNV wyniosła 0,71, co jest wartością powyżej progu 0,70 przyjętego dla zaklasyfikowania wariantu jako homozygotycznego. Amplikonem o najniższym odsetku prawidłowych rozpoznań (98,2%) był amplikon 17, dla którego stwierdzono 40 przypadków braku rozpoznania, a który zawierał powtórzenia AT oraz miał zawartość GC na poziomie 27%.

Tabela 2 Dokładność aparatu MiSeqDx na poziomie ampliconu

| Amplicon | Chromosom | Początek ampliconu | Koniec ampliconu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny ampliconu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,43 | 1992 | 0 | 0 | 100 |
| 19 | 3 | 49851331 | 49851400 | 70 | 70 | CT(3), indel | 0,49 | 1680 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|--------------|---|--|---|---|
| 20 | 3 | 189713161 | 189713248 | 88 | 88 | PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3) | 0,41 | 2112 | 0 | 0 | 100 |
| 21 | 3 | 190106030 | 190106104 | 75 | 74 | Indel | 0,57 | 1774 | 0 | 2 | 99,9 |
| 22 | 4 | 2233667 | 2233744 | 78 | 78 | PolyA (6) | 0,26 | 1872 | 0 | 0 | 100 |
| 23 | 4 | 7780541 | 7780637 | 97 | 97 | PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5) | 0,42 | 2328 | 0 | 0 | 100 |
| 24 | 4 | 15688604 | 15688681 | 78 | 78 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 0,44 | 1752 | 0 | 0 | 100 |
| 44 | 7 | 66276100 | 66276187 | 88 | 88 | Indel | 0,35 | 2112 | 0 | 0 | 100 |
| 45 | 7 | 77365735 | 77365821 | 87 | 87 | PolyA (7), AG (4) | 0,26 | 2088 | 0 | 0 | 100 |
| 46 | 7 | 110939946 | 110940030 | 85 | 85 | Indel | 0,38 | 2040 | 0 | 0 | 100 |
| 47 | 7 | 128533468 | 128533557 | 90 | 90 | PolyG (5), indel | 0,62 | 2160 | 0 | 0 | 100 |
| 48 | 7 | 149503875 | 149503965 | 91 | 91 | PolyG (6), PolyC (6), indel | 0,71 | 2184 | 0 | 0 | 100 |
| 49 | 7 | 154404519 | 154404599 | 81 | 66 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 0,49 | 1920 | 0 | 0 | 100 |
| 66 | 10 | 118351373 | 118351453 | 81 | 81 | Nd. | 0,51 | 1944 | 0 | 0 | 100 |
| 67 | 11 | 8159816 | 8159912 | 97 | 96 | Nd. | 0,45 | 2304 | 0 | 0 | 100 |
| 68 | 11 | 30177648 | 30177717 | 70 | 70 | Indel | 0,46 | 1680 | 0 | 0 | 100 |
| 69 | 11 | 47470345 | 47470444 | 100 | 100 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 0,25 | 1992 | 0 | 0 | 100 |
| 89 | 14 | 46958962 | 46959034 | 73 | 72 | PolyT (5), indel | 0,19 | 1727 | 0 | 1 | 99,9 |
| 90 | 14 | 58050030 | 58050110 | 81 | 81 | Indel | 0,38 | 1944 | 0 | 0 | 100 |
| 91 | 14 | 82390559 | 82390649 | 91 | 91 | Indel | 0,35 | 2184 | 0 | 0 | 100 |
| 92 | 14 | 92549544 | 92549609 | 66 | 66 | PolyA (5) | 0,41 | 1584 | 0 | 0 | 100 |
| 93 | 14 | 102808496 | 102808589 | 94 | 94 | Indel | 0,62 | 2256 | 0 | 0 | 100 |
| 94 | 15 | 43170751 | 43170848 | 98 | 96 | PolyC (5) | 0,45 | 2304 | 0 | 0 | 100 |
| 95 | 15 | 63446149 | 63446216 | 68 | 68 | Indel | 0,25 | 1632 | 0 | 0 | 100 |
| 96 | 15 | 77879807 | 77879901 | 95 | 93 | PolyG (5), indel | 0,68 | 2232 | 0 | 0 | 100 |
| 97 | 15 | 81625334 | 81625428 | 95 | 95 | PolyT (6) | 0,43 | 2280 | 0 | 0 | 100 |
| 98 | 15 | 85438263 | 85438334 | 72 | 71 | Indel | 0,65 | 1704 | 0 | 0 | 100 |
| 99 | 15 | 89817413 | 89817503 | 91 | 91 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | PolyT (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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|
| 110 | 17 | 33998759 | 33998849 | 91 | 89 | PolyT (5) | 0,54 | 2136 | 0 | 0 | 100 |
| 111 | 17 | 39589691 | 39589774 | 84 | 82 | PolyA (13), indel (x2) | 0,29 | 1944 | 7 | 17 | 98,8 |
| 112 | 17 | 41244394 | 41244484 | 91 | 91 | PolyA (5) | 0,34 | 2184 | 0 | 0 | 100 |
| 113 | 17 | 45438866 | 45438957 | 92 | 92 | PolyA (7), AT (3), AT(4), AT(4), indel | 0,26 | 2208 | 0 | 0 | 100 |
| 114 | 17 | 61502432 | 61502510 | 79 | 79 | Indel | 0,41 | 1887 | 0 | 9 | 99,5 |
| 115 | 17 | 64023582 | 64023667 | 86 | 86 | PolyT (7) | 0,22 | 2064 | 0 | 0 | 100 |
| 116 | 17 | 72308237 | 72308320 | 84 | 84 | GAG(3) | 0,62 | 2016 | 0 | 0 | 100 |
| 117 | 18 | 2616456 | 2616522 | 67 | 67 | GA(3) | 0,31 | 1608 | 0 | 0 | 100 |
| 118 | 18 | 6980478 | 6980568 | 91 | 91 | Nd. | 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 | Nd. | 0,48 | 1560 | 0 | 0 | 100 |
| 124 | 19 | 625143 | 625241 | 99 | 99 | Nd. | 0,59 | 2376 | 0 | 0 | 100 |
| 125 | 19 | 18121418 | 18121491 | 74 | 74 | Nd. | 0,68 | 1775 | 1 | 0 | 99,9 |
| 126 | 19 | 18186574 | 18186643 | 70 | 70 | Nd. | 0,64 | 1680 | 0 | 0 | 100 |
| 127 | 20 | 746056 | 746149 | 94 | 94 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 133 | 20 | 62331904 | 62331994 | 91 | 88 | PolyG (6) | 0,73 | 2112 | 0 | 0 | 100 |
| 134 | 20 | 62690860 | 62690946 | 87 | 87 | Indel | 0,57 | 2088 | 0 | 0 | 100 |
| 135 | 21 | 30300823 | 30300888 | 66 | 66 | Indel | 0,35 | 1584 | 0 | 0 | 100 |
| 136 | 21 | 33694176 | 33694273 | 98 | 98 | PolyT (6), CA (3) | 0,54 | 2352 | 0 | 0 | 100 |
| 137 | 21 | 36710706 | 36710792 | 87 | 87 | GT(3), indel | 0,39 | 2088 | 0 | 0 | 100 |
| 138 | 21 | 46644924 | 46644992 | 69 | 69 | PolyA (6), AG (3), indel | 0,32 | 1656 | 0 | 0 | 100 |
| 139 | 21 | 46705575 | 46705664 | 90 | 90 | PolyT (5), PolyA (6) | 0,5 | 2160 | 0 | 0 | 100 |
| 140 | 22 | 25750774 | 25750873 | 100 | 100 | Indel | 0,63 | 2400 | 0 | 0 | 100 |
| 141 | 22 | 32439233 | 32439329 | 97 | 97 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,52 | 1704 | 0 | 0 | 100 |
| 148 | Y | 2655397 | 2655461 | 65 | 0 | Nd. | 0,55 | 0 | 0 | 0 | Nd. |
| 149 | Y | 2655519 | 2655609 | 91 | 0 | Nd. | 0,48 | 0 | 0 | 0 | Nd. |
| 150 | Y | 2655609 | 2655679 | 71 | 0 | PolyA (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | Nd. |

Warianty, dla których stwierdzono brak rozpoznań, wymieniono w [Tabela 3](#). Filtry, których zastosowanie skutkowało brakiem rozpoznań, zostały wymienione w tabeli. Insercję w amplikonie 111 odfiltrowano w dziewięciu na 16 wystąpień, zaś w pozostałych siedmiu przypadkach wariant został rozpoznany jako referencyjny (wynik FN).

Tabela 3 Podsumowanie wariantów, dla których stwierdzono brak rozpoznania

| Nr amplikonu | Chr:Pozycja | Wariant | Zawartość odpowiedniego amplikonu | Filtr | Warianty pominięte | Warianty oczekiwane | Rozpoznania fałszywie ujemne |
|--------------|-------------|---------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------------------|
| 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: Ponownie zastosować filtr. Wariant jest odfiltrowywany, jeśli całość lub część sekwencji wariantu występuje powtarzalnie w genomie referencyjnym sąsiednio do pozycji wariantu. W oznaczeniu referencyjnym wymaganych jest co najmniej dziewięć powtórzeń, przy uwzględnieniu jedynie powtórzeń o długości nie większej niż 5 bp.

Wyniki sekwencjonowania próbki NA12878 porównano z genotypem o wysokim poziomie ufności, ustalonym dla próbki NA12878 przez ośrodek National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Na sumaryczną liczbę 150 amplikonów 92 w pełni zawierało się w regionach genomu o wysokim poziomie ufności, 41 częściowo nakładało się na te regiony, natomiast 17 nie nakładało się na sekwencję NIST. W rezultacie dla każdego powtórzenia uzyskano 10 000 współrzędnych do porównań. Rozpoznane nukleotydy niewariantowe zostały porównane z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego. Wyniki oznaczeń dokładności zawiera [Tabela 4](#).

Tabela 4 Zgodność wyników rozpoznania nukleotydów przy użyciu aparatu MiSeqDx dla próbki NA12878 z bazy danych NIST

| Próbka | Liczba amplikonów | Średni odsetek rozpoznania | Całkowita liczba wariantów TP | Całkowita liczba wariantów FN | Całkowita liczba rozpoznania TN | Całkowita liczba rozpoznania FP | PPA | NPA | OPA |
|---------|-------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|
| NA12878 | 133 | 99,98 | 208 | 0 | 19380 | 0 | 100 | 100 | 100 |

Próbki poddano dalszej analizie pod kątem rozpoznawania małych insercji i delecji (polimorfizmów typu indel) ([Tabela 5](#)). W niektórych przypadkach polimorfizmy typu indel były wspólne dla dwóch lub większej liczby próbek, co znalazło odzwierciedlenie w kolumnie „Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel”. Wyniki dla obu powtórzeń 12 ważnych próbek podano w [Tabela 5](#). Obecnych było w sumie 71 polimorfizmów typu indel o wielkości od 1 do 24 bp w przypadku insercji i od 1 do 25 bp w przypadku delecji. Wykryto 69 polimorfizmów typu indel z dodatnią zgodnością procentową wynoszącą 100%. Jedna delecja (amplikon 64; delecja 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) nie została prawidłowo rozpoznana, ponieważ żadnego z tych wariantów nie można było rozpoznać ze względu na filtr R5x9. W związku z tym nie można obliczyć PPA, która wyklucza brak rozpoznania. Kolejny polimorfizm typu indel, insercja 1 bp (chr17 39589692 C>CA na amplikonie 111), również nie została prawidłowo rozpoznana, ponieważ dziewięciu wariantów nie można było rozpoznać ze względu na filtr R5x9, a siedem zostało rozpoznane jako FN.

Tabela 5 Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel przy użyciu aparatu MiSeqDx

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbek z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|-----------|---------------------------------|---|------------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 1 | 1 | 36450544 | 93 | Delecja 25 bp | GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 2 | 1 | 109465165 | 79 | Delecja 3 bp | ACTT>A | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 3 | 1 | 218353908 | 91 | Insercja 23 bp | T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 4 | 1 | 223906701 | 92 | Delecja 17 bp | GACAGACTGTGAGGAAGA>G | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 6 | 1 | 236372081 | 70 | Insercja 5 bp | C>CTTAAG | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 7 | 1 | 247812083 | 88 | Insercja 3 bp | C>CATG | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 8 | 2 | 55862804 | 90 | Insercja 7 bp | T>TTTGGTAA | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 9 | 2 | 87003972 | 80 | Delecja 6 bp | TTATCTC>T | 6 | 0 | 0 | 6 | 100 |
| 13 | 2 | 200796749 | 87 | Insercja 5 bp | T>TTAAAA | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 14 | 2 | 212245090 | 91 | Insercja 12 bp | C>CTGAAAATAGGAT | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 16 | 2 | 235016388 | 73 | Insercja 2 bp | A>ATG | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 17 | 3 | 4466274 | 93 | Delecja 23 bp | TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 19 | 3 | 49851375 | 70 | Insercja 9 bp | C>CCTGGCTCCT | 4 | 0 | 0 | 4 | 100 |
| 21 | 3 | 190106071 | 75 | Delecja 1 bp | AG>A | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 25 | 4 | 56236567 | 66 | Delecja 8 bp | TAACCGAAA>T | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 27 | 4 | 164446785 | 62 | Insercja 11 bp | T>TTATGGTATTGA | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 31 | 5 | 74077155 | 83 | Delecja 4 bp | TAGTA>T | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 34 | 5 | 155662255 | 75 | Insercja 8 bp | G>GCCTACTGA | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 36 | 6 | 24950035 | 92 | Delecja 21 bp | CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 37 | 6 | 31084942 | 100 | Delecja 3 bp | GCTT>G | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 39 | 6 | 32986905 | 95 | Delecja 25 bp | CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 41 | 6 | 41647442 | 95 | Delecja 23 bp | GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G | 8 | 0 | 0 | 8 | 100 |
| 44 | 7 | 66276142 | 88 | Insercja 1 bp | C>CT | 16 | 0 | 0 | 16 | 100 |
| 46 | 7 | 110939983 | 85 | Delecja 4 bp | CAAGT>C | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 47 | 7 | 128533514 | 90 | Insercja 1 bp | T>TC | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 48 | 7 | 149503916 | 91 | Delecja 4 bp | GGATA>G | 8 | 0 | 0 | 8 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|-----------|---------------------------------|---|-----------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 50 | 7 | 156476548 | 93 | Delecja 11 bp | GAATCTGCACTT>G | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 52 | 8 | 24811064 | 90 | Delecja 1 bp | AG>A | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 53 | 8 | 76518677 | 67 | Insercja 4 bp | T>TACTG | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 55 | 9 | 105586193 | 65 | Insercja 4 bp | C>CAATT | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 58 | 9 | 138995370 | 97 | Delecja 21 bp | TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 59 | 10 | 5987158 | 79 | Delecja 3 bp | TAAC>T | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 63 | 10 | 45084202 | 95 | Delecja 16 bp | AGCGTCTATAACCAAT>A | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 64 | 10 | 55892600 | 89 | Delecja 2 bp | TAC>T | 10 | 10 | 0 | 0 | Nd. |
| 68 | 11 | 30177690 | 70 | Insercja 2 bp | C>CTG | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 70 | 11 | 59837721 | 62 | Insercja 8 bp | T>TTATGAAAA | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 75 | 11 | 118406328 | 85 | Delecja 8 bp | CAGTGTGGA>C | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 76 | 11 | 120357842 | 85 | Delecja 2 bp | CTT>C | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 78 | 12 | 2834814 | 84 | Insercja 21 bp | T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 84 | 13 | 25817002 | 89 | Insercja 19 bp | C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 85 | 13 | 44880152 | 89 | Insercja 4 bp | C>CCTGT | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 86 | 13 | 77665265 | 77 | Delecja 20 bp | ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 89 | 14 | 46958967 | 73 | Delecja 22 bp | TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 90 | 14 | 58050081 | 81 | Insercja 4 bp | C>CTGAT | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 91 | 14 | 82390602 | 91 | Delecja 16 bp | CTTGCTCTATAAACCGT>C | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 93 | 14 | 102808554 | 94 | Delecja 5 bp | CGTGGA>C | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 95 | 15 | 63446199 | 68 | Delecja 6 bp | CAAAATT>C | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 96 | 15 | 77879862 | 95 | Delecja 25 bp | GCCCCTGAGCCAGCCTCCCCTCTTA>G | 14 | 0 | 0 | 14 | 100 |
| 98 | 15 | 85438311 | 72 | Insercja 3 bp | C>CTTG | 8 | 0 | 0 | 8 | 100 |
| 100 | 15 | 89864316 | 70 | Insercja 4 bp | G>GCTAC | 8 | 0 | 0 | 8 | 100 |
| 105 | 16 | 85706416 | 91 | Delecja 7 bp | ATTATTTC>A | 16 | 0 | 0 | 16 | 100 |
| 107 | 17 | 3594276 | 87 | Delecja 1 bp | TG>T | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 108 | 17 | 3970133 | 91 | Insercja 18 bp | A>ATCCTATTCTACTCTGAAT | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|----------|---------------------------------|---|-----------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 109 | 17 | 16084985 | 93 | Insercja 4 bp | A>AACAC | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 111 | 17 | 39589692 | 84 | Insercja 1 bp | C>CA | 16 | 9 | 7 | 0 | 0 |
| 112 | 17 | 39589739 | 84 | Insercja 24 bp | T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 113 | 17 | 45438886 | 92 | Delecja 4 bp | CAGTG>C | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |
| 114 | 17 | 61502459 | 79 | Delecja 12 bp | TTTGTATCTGCTG>T | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 120 | 18 | 38837054 | 75 | Insercja 22 bp | T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 121 | 18 | 47405425 | 81 | Insercja 3 bp | T>TGAG | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 122 | 18 | 54815706 | 85 | Delecja 2 bp | ACT>A | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 130 | 20 | 21766863 | 70 | Delecja 15 bp | TACTTGAGAACTGAGG>T | 4 | 0 | 0 | 4 | 100 |
| 131 | 20 | 25278464 | 101 | Insercja 5 bp | A>AGTGGG | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 132 | 20 | 50897361 | 67 | Insercja 11 bp | G>GGAATGTCAGCC | 24 | 0 | 0 | 24 | 100 |
| 134 | 20 | 62690925 | 87 | Delecja 16 bp | TCCTGGCTGGCCTGTGG>T | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 135 | 21 | 30300873 | 66 | Insercja 11 bp | G>GATAAACTTTA | 10 | 0 | 0 | 10 | 100 |
| 137 | 21 | 36710749 | 87 | Delecja 21 bp | ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A | 16 | 0 | 0 | 16 | 100 |
| 138 | 21 | 46644985 | 69 | Delecja 5 bp | GTTGTT>G | 8 | 0 | 0 | 8 | 100 |
| 140 | 22 | 25750814 | 100 | Insercja 6 bp | C>CAGGGCA | 20 | 0 | 0 | 20 | 100 |
| 142 | 22 | 37409885 | 97 | Insercja 5 bp | C>CTGTTT | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 144 | 22 | 47081407 | 92 | Delecja 10 bp | GGGCACAGGCA>G | 12 | 0 | 0 | 12 | 100 |

Odtwarzalność

Przeprowadzono dwa badania mające na celu ocenę odtwarzalności aparatu MiSeqDx w przypadku linii komórkowych (badanie 1 i 2) lub krwi o obniżonej zawartości leukocytów z dodatkiem linii komórkowych (badanie 2). W badaniu 1 wykorzystywano wiele aparatów. W badaniu 2 wykorzystywano wiele stanowisk.

Badanie 1

Odtwarzalność oznaczeń przy użyciu aparatu MiSeqDx wyznaczano przy użyciu dwóch aparatów, dwóch operatorów i dwóch zestawów odczynników w całkowitej liczbie ośmiu przebiegów. Oznaczenie reprezentatywne, próbki i metoda referencyjna były takie same, jak opisane dla badania dokładności.

Wyniki przedstawiono w podziale na poszczególne amplikony dla każdego z aparatów (Tabela 6) tak, by wykazać odtwarzalność rozpoznań na różnych aparatach. Odsetek prawidłowych rozpoznań wyznaczano po uwzględnieniu zarówno nieprawidłowych rozpoznań, jak i braku rozpoznań (niespełnienia jednego lub większej liczby filtrów rozpoznawania wariantów). Oba aparaty charakteryzowały się podobną liczbą braków rozpoznań i nieprawidłowych rozpoznań dla poszczególnych amplikonów.

Tabela 6 Badanie – wyniki odtwarzalności badań między aparatami MiSeqDx (na poziomie amplikonu)

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 10 | 2 | 177016721 | 177016805 | 85 | 81 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 17 | 3 | 44662229 | 4466321 | 93 | 93 | AT(3), indel | 0,27 | 8761 | 0 | 167 | 8760 | 0 | 168 |
| 18 | 3 | 46620561 | 46620643 | 83 | 83 | Nd. | 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 | PoliA (5), PoliT (5) PoliA (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 | PoliA (6), PoliT (5) PolyA (5) | 0,42 | 9312 | 0 | 0 | 9312 | 0 | 0 |
| 24 | 4 | 15688604 | 15688681 | 78 | 78 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 26 | 4 | 102839244 | 102839314 | 71 | 69 | PolyA (5) | 0,46 | 6624 | 0 | 0 | 6624 | 0 | 0 |
| 27 | 4 | 1644467434 | 164446804 | 62 | 62 | PolyA (7), indel | 0,27 | 5952 | 0 | 0 | 5952 | 0 | 0 |
| 28 | 5 | 1882081 | 1882158 | 78 | 75 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 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 | Nd. | 0,44 | 7008 | 0 | 0 | 7008 | 0 | 0 |
| 44 | 7 | 66276100 | 66276187 | 88 | 88 | Indel | 0,35 | 8448 | 0 | 0 | 8448 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 0,49 | 7680 | 0 | 0 | 7680 | 0 | 0 |
| 66 | 10 | 118351373 | 118351453 | 81 | 81 | Nd. | 0,51 | 7776 | 0 | 0 | 7776 | 0 | 0 |
| 67 | 11 | 8159816 | 8159912 | 97 | 96 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,52 | 7008 | 0 | 0 | 7008 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 0,37 | 8736 | 0 | 0 | 8736 | 0 | 0 |
| 119 | 18 | 9888026 | 9888094 | 69 | 69 | PolyA (6), TG(3) | 0,43 | 6624 | 0 | 0 | 6624 | 0 | 0 |
| 120 | 18 | 38836999 | 38837073 | 75 | 75 | PolyA (5), indel | 0,37 | 7200 | 0 | 0 | 7200 | 0 | 0 |
| 121 | 18 | 47405382 | 47405462 | 81 | 81 | CTC(3), indel | 0,47 | 7776 | 0 | 0 | 7776 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 122 | 18 | 54815665 | 54815749 | 85 | 85 | CT(3), indel | 0,45 | 8160 | 0 | 0 | 8160 | 0 | 0 |
| 123 | 18 | 59773996 | 59774060 | 65 | 65 | Nd. | 0,48 | 6240 | 0 | 0 | 6240 | 0 | 0 |
| 124 | 19 | 625143 | 625241 | 99 | 99 | Nd. | 0,59 | 9504 | 0 | 0 | 9504 | 0 | 0 |
| 125 | 19 | 18121418 | 18121491 | 74 | 74 | Nd. | 0,68 | 7102 | 2 | 0 | 7104 | 0 | 0 |
| 126 | 19 | 18186574 | 18186643 | 70 | 70 | Nd. | 0,64 | 6718 | 2 | 0 | 6718 | 2 | 0 |
| 127 | 20 | 746056 | 746149 | 94 | 94 | Nd. | 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 | Nd. | 0,68 | 9312 | 0 | 0 | 9312 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 142 | 22 | 37409844 | 37409940 | 97 | 97 | Indel | 0,46 | 9312 | 0 | 0 | 9312 | 0 | 0 |
| 143 | 22 | 37637596 | 37637694 | 99 | 99 | Nd. | 0,6 | 9504 | 0 | 0 | 9504 | 0 | 0 |
| 144 | 22 | 47081347 | 47081438 | 92 | 92 | Indel | 0,66 | 8832 | 0 | 0 | 8832 | 0 | 0 |
| 145 | X | 15870424 | 15870492 | 69 | 69 | PolyT (5) | 0,26 | 6624 | 0 | 0 | 6624 | 0 | 0 |
| 146 | X | 135288543 | 135288611 | 69 | 69 | PolyC (5) | 0,62 | 6624 | 0 | 0 | 6624 | 0 | 0 |
| 147 | X | 135290777 | 135290847 | 71 | 71 | Nd. | 0,52 | 6816 | 0 | 0 | 6816 | 0 | 0 |
| 148 | Y | 2655397 | 2655461 | 65 | 0 | Nd. | 0,55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 149 | Y | 2655519 | 2655609 | 91 | 0 | Nd. | 0,48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | Y | 2655609 | 2655679 | 71 | 0 | PolyA (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Wyniki badania odtwarzalności analizowano dla poszczególnych operatorów w oparciu o częstość wariantów (Tabela 7). Analiza wykazała spójność częstości wariantów wykrywanych przez operatorów. Przedstawiono wartości średniej częstości wariantu +/- 1 odchylenie standardowe.

Tabela 7 Wyniki oznaczeń przy użyciu aparatu MiSeqDx dokonywanych przez poszczególnych operatorów

| Zakres częstości wariantu | Liczba unikalnych wariantów | Całkowita liczba wariantów analizowanych przez operatora 1 | Całkowita liczba wariantów analizowanych przez operatora 2 | Średnia (SD) częstość wariantu raportowana przez operatora 1 | Średnia (SD) częstość wariantu raportowana przez operatora 2 |
|------------------------------|-----------------------------|--|--|--|--|
| Homozygotyczne (0,70–1,00) | 2424 | 2424 | 2422 | 0,94 +/- 0,07 | 0,96 +/- 0,05 |
| Heterozygotyczne (0,20–0,70) | 8240 | 8132 | 8128 | 0,48 +/- 0,04 | 0,49 +/- 0,04 |

Wyniki badania odtwarzalności dla poszczególnych próbek zawierają dane ze wszystkich ośmiu przebiegów (Tabela 8). Wykrywalność została oceniona oddzielnie dla każdego rodzaju wariantu – SNV, insercji i delecji. Pozycje referencyjne zostały wykluczone. Analiza wykazała, że uzyskane wyniki dotyczące wariantów były powtarzalne we wszystkich próbkach.

Tabela 8 Zgodność wyników rozpoznawania nukleotydów przez aparat MiSeqDx w zależności od próbki

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

Dane uzyskane w oparciu o osiem przebiegów w przedstawionym badaniu odtwarzalności potwierdzają twierdzenie, że aparat MiSeqDx jest w stanie w sposób spójny sekwencjonować:

- Zawartość GC $\geq 19\%$ (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów z 19% zawartością GC rozpoznane prawidłowo z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 1,1%).
- Zawartość GC $\leq 78\%$ (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów z 78% zawartością GC rozpoznane prawidłowo przy braku nierozpoznanych nukleotydów).
- Łańcuchy PolyA o długości ≤ 8 (powtórzenie PolyA złożone z 8 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyA = 8).
- Łańcuchy PolyT o długości ≤ 10 (powtórzenie PolyT złożone z 10 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyT = 10).
- Łańcuchy PolyG o długości ≤ 7 (powtórzenie PolyG złożone z 7 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyG = 7).

- Łańcuchy PolyC o długości ≤ 6 (powtórzenie PolyC złożone z 6 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 576 z 576 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyC = 6).
- Powtórzenia dinukleotydy o długości $\leq 11x$ (wszystkie zidentyfikowane nukleotydy z 11-krotnym powtórzeniem dinukleotydu w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0,5%).
- Powtórzenia trinukleotydy o długości $\leq 5x$ (wszystkie zidentyfikowane nukleotydy z 5-krotnym powtórzeniem trinukleotydu w 192 ze 192 sekwencjonowanych amplikonów zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0,5%).
- Insercje 24 lub mniej nukleotydów i delecje 25 lub mniej nukleotydów:
 - insercje 24 lub mniej nukleotydów zidentyfikowane prawidłowo w 192 ze 192 próbek,
 - delecje 25 nukleotydów zidentyfikowane poprawnie w 223 próbkach przy nieprawidłowym rozpoznaniu 1 na 224 próbki.

Badanie 2

Przeprowadzono badanie odtwarzalności wyników między stanowiskami przy użyciu reprezentatywnego oznaczenia – testu Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu powiązanego z mukowiscydozą, obejmujące zmiany genu *CFTR* o znaczeniu klinicznym, przeanalizowane za pomocą oprogramowania MiSeq Reporter z wykorzystaniem procedury ukierunkowanego sekwencjonowania DNA przy użyciu aparatu MiSeqDx. Zaślepienie badanie przeprowadzono na 3 stanowiskach badawczych; na każdym z nich było 2 operatorów. Każdy z operatorów na każdym stanowisku przebadał dwa dobrze scharakteryzowane panele po 46 próbek, co dało łącznie 810 rozpoznań na stanowisko. Panele zawierały mieszaninę genomowego DNA z linii komórkowych ze znanymi wariantami w genie *CFTR*, a także krew o obniżonej zawartości leukocytów zmieszaną z liniami komórkowymi ze znanymi wariantami w genie *CFTR*. Próbkę krwi dostarczono w celu przeprowadzenia czynności ekstrakcji do przygotowania gDNA będącego materiałem wejściowym w procedurze oznaczenia. Odsetek prawidłowych próbek, określany jako liczba próbek spełniających wymagania parametrów kontroli jakości w pierwszej próbie, wyniósł 99,88%. Wszystkie wyniki testu dotyczą pierwszego badania.

Tabela 9 Podsumowanie wyników badania odtwarzalności przeprowadzonego przy użyciu reprezentatywnym testu MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay do oznaczania 139 wariantów genu powiązanego z mukowiscydozą

| Panel | Nr próbki | Genotyp próbki | Warianty | Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko | Rozpoznania ze zgodnością dodatnią (warianty) | | | Rozpoznania ze zgodnością ujemną (typu dzikiego) | | | Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Zgodność dodatnia (%) | Zgodność ujemna (%) | Zgodność ogólna (%) |
|-------|-----------------|----------------------------|-------------------------------------|--|---|----------------|----------------|--|----------------|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | | | | | |
| A | 1 | S549N (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 2 | 1812-1G>A (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 3 | Q493X/F508del (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 4 ¹ | F508del/2184delA (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 797 | 798 | 798 | 0 | 1 ¹ | 100 | 100 | 100 |
| A | 5 ² | Y122X/R1158X (HET) | | 810 | 12 | 10 | 12 | 798 | 665 | 798 | 0 | 135 ² | 94,44 | 94,44 | 94,44 |
| A | 6 | F508del/2183AA>G (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 7 | R75X (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 8 | I507del/F508del (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 9 ³ | F508del/W1282X (HET) | | 810 | 12 | 11 | 12 | 798 | 797 | 798 | 2 ³ | 0 | 97,22 | 99,96 | 99,92 |
| A | 10 ³ | F508del/3272-26A>G (HET) | | 810 | 12 | 11 | 12 | 798 | 797 | 798 | 2 ³ | 0 | 97,22 | 99,96 | 99,92 |
| A | 11 | F508del/3849+10kbC>T (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 12 | 621+1G>T/3120+1G>A (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 13 | E60X/F508del (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 14 | M1101K (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 15 | M1101K (HOM) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| A | 16 | F508del (HOM) | I506V, I507V, F508C – brak | 828 | 6 | 6 | 6 | 822 | 822 | 822 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |

| Panel | Nr próbki | Genotyp próbki | Warianty | Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko | Rozpoznanie ze zgodnością dodatnią (warianty) | | | Rozpoznanie ze zgodnością ujemną (typu dzikiego) | | | Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Zgodność dodatnia (%) | Zgodność ujemna (%) | Zgodność ogólna (%) |
|-------|-----------|----------------------------|-----------------------------------|--|---|----------------|----------------|--|----------------|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 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 | Nd. | 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 | Nd. | 100 | 100 |

| Panel | Nr próbki | Genotyp próbki | Warianty | Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko | Rozpoznanie ze zgodnością dodatnią (warianty) | | | Rozpoznanie ze zgodnością ujemną (typu dzikiego) | | | Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Zgodność dodatnia (%) | Zgodność ujemna (%) | Zgodność ogólna (%) |
|-------|-----------|-----------------------------|-----------------------------------|--|---|----------------|----------------|--|----------------|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Panel | Nr próbki | Genotyp próbki | Warianty | Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko | Rozpoznanie ze zgodnością dodatnią (warianty) | | | Rozpoznanie ze zgodnością ujemną (typu dzikiego) | | | Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Zgodność dodatnia (%) | Zgodność ujemna (%) | Zgodność ogólna (%) |
|-------|-----------------|--------------------------|----------|--|---|----------------|----------------|--|----------------|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | | | | | |
| B | 54 | 394delTT (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 55 | F508del (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 56 | WT | | 810 | 0 | 0 | 0 | 810 | 810 | 810 | 0 | 0 | Nd. | 100 | 100 |
| B | 57 | WT | | 810 | 0 | 0 | 0 | 810 | 810 | 810 | 0 | 0 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 100 | 100 |
| B | 71 | E92X/F508del (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 72 ⁴ | 621+1G>T/1154insTC (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 797 | 0 | 1 ⁴ | 100 | 99,96 | 99,96 |
| B | 73 | G542X (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 74 | F508del (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 75 ² | F508del (HET) | | 810 | 6 | 5 | 6 | 804 | 670 | 804 | 0 | 135 ² | 94,44 | 94,44 | 94,44 |
| B | 76 | F508del (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |

| Panel | Nr próbki | Genotyp próbki | Warianty | Łączna liczba rozpoznanych nukleotydów na stanowisko | Rozpoznanie ze zgodnością dodatnią (warianty) | | | Rozpoznanie ze zgodnością ujemną (typu dzikiego) | | | Liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Zgodność dodatnia (%) | Zgodność ujemna (%) | Zgodność ogólna (%) |
|---------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------|--|---|----------------|----------------|--|----------------|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | | | | | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | Stanowisko o 1 | Stanowisko o 2 | Stanowisko o 3 | | | | | |
| B | 77 | 621+1G>T/A455E (HET) | | 810 | 12 | 12 | 12 | 798 | 798 | 798 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 78 | 1812-1G>A (HET) | | 810 | 6 | 6 | 6 | 804 | 804 | 804 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| B | 79 | WT | | 810 | 0 | 0 | 0 | 810 | 810 | 810 | 0 | 0 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| Łącznie | | | | 74556 | 2209 | | | 221182 | | | 4 | 273 | 99,77 | 99,88 | 99,88 |

¹ Lokacja typu dzikiego dotycząca wariantu N1303K w jednym powtórzeniu dała wynik nierozpoznanych nukleotydów ze względu na niewystarczające pokrycie.

² Jedno powtórzenie próbek 5 i 75 dało stopień rozpoznania 0%. Dalsze dochodzenie wykazało, że próbki mogły nie zostać umieszczone na płytce przed przygotowaniem biblioteki, ponieważ objętości próbek pozostałych w probówkach zgadzały się z objętością, która nie została usunięta.

³ Badanie wykazało, że próbki 9 i 10 zostały prawdopodobnie zamienione przez operatora przed przygotowaniem biblioteki.

⁴ Lokacja typu dzikiego dotycząca wariantu M1V w jednym powtórzeniu każdej z dwóch próbek dała wynik No Call ze względu na niewystarczające pokrycie.

Cechy wydajności – linia somatyczna

W opisywanych tu badaniach do analizy danych z sekwencjonowania wykorzystywano moduł do oznaczania wariantów somatycznych, z wyjątkiem badań wykorzystujących panel dwugenowy, w których wykorzystywano moduł swoisty dla oznaczenia.

Dokładność

Przeprowadzono trzy badania mające na celu ocenę dokładności wykonywanych w aparacie MiSeqDx oznaczeń DNA wyodrębnionego z próbek FFPE.

Badanie 1

W tym badaniu użyto oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania różnych genów obejmujących 12 588 nukleotydów znajdujących się w 23 różnych chromosomach przy użyciu 150 ampliconów. Chromosom Y nie zawiera regionów o wysokiej ufności i nie został poddany badaniu. W badaniu użyto pięciu unikalnych próbek pochodzących od jednej rodziny – dwojga rodziców i trojga dzieci – które wcześniej były często sekwencjonowane różnymi metodami przez wiele laboratoriów. Dostępne są trzy próbki pochodzące od osób płci żeńskiej oraz dwie próbki pochodzące od osób płci męskiej. Przed ekstrakcją DNA na potrzeby badania wszystkie próbki utrwalono w formalinie i zatopiono w parafinie. Próbkę GM12877 rozcieńczono na poziomie DNA próbką GM12878, tworząc próbkę GM12877-D zawierającą zestaw wariantów o częstościach zbliżonych do 5% i 10%. Każdą próbkę badano w dwóch powtórzeniach, z wyjątkiem próbki GM12877-D, którą badano w pięciu powtórzeniach. Dokładność została określona dla wariantów SNV, insercji i delecji przez porównanie danych z badania z dobrze scharakteryzowaną referencyjną bazą danych. Sekwencję w referencyjnej bazie danych (Platinum Genomes wersja 2016-01) uzyskano w wyniku połączenia wielu metod sekwencjonowania, publicznie dostępnych danych oraz informacji o dziedziczeniu. O ile nie podano inaczej, regiony o wysokim poziomie ufności zostały zdefiniowane w oparciu o ww. metodę referencyjną. Łącznie próbki poddano przebiegowi osiem razy. Tabele przedstawione w celu wykazania dokładności bazują na danych z pierwszego przebiegu.

Tabela 10 zawiera dane z badania prezentowane w postaci procentowych zgodności wyników dodatnich i ujemnych dla poszczególnych próbek, przy czym na potrzeby obliczeń zgodności PPA wyniki wariantów są porównywane z dobrze scharakteryzowanymi, złożonymi danymi referencyjnymi. Trzy typy wariantów (SNV, insercje i delecje) zostały ze sobą połączone. Ponieważ metoda referencyjna dostarcza tylko wyniki dotyczące wariantów pojedynczych nukleotydów oraz insercji/delecji, wyniki nukleotydów niewariantowych na potrzeby obliczeń zgodności NPA porównywane są z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego.

Tabela 10 Zgodność wyników rozpoznawania nukleotydów przy użyciu aparatu MiSeqDx z danymi referencyjnymi dotyczącymi 6 dobrze scharakteryzowanych próbek

| Próbka | Średni odsetek rozpoznań | Całkowita liczba wariantów | Całkowita liczba wariantów TP | Całkowita liczba wariantów FN | Całkowita liczba rozpoznań TN | PPA | NPA | OPA |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|
| GM12877 | 98,7 | 152 | 147 | 0 | 23719 | 100 | 100 | 100 |
| GM12878 | 98,4 | 270 | 260 | 0 | 23482 | 100 | 100 | 100 |
| GM12879 | 98,7 | 192 | 186 | 0 | 23744 | 100 | 100 | 100 |
| GM12885 | 99,1 | 244 | 236 | 0 | 23713 | 100 | 100 | 100 |
| GM12886 | 98,7 | 230 | 226 | 0 | 23652 | 100 | 100 | 100 |
| GM12877-D ¹ | | 675 | 650 | 0 | | 100 | 100 | 100 |
| GM12877-D ² | 98,4 | 155 | 155 | 0 | 57608 | 100 | 100 | 100 |

¹ Warianty z częstością większą niż 20%.

² Warianty z częstością mniejszą niż 20%.

Zaprojektowano 150 amplikonów tak, by pokryć szeroki zakres różnorodności materiału genetycznego. Zawartość GC w amplikonach mieściła się w zakresie 26–87%. Amplikony charakteryzowały się również pewnym zakresem powtórzeń pojedynczych nukleotydów (np. PolyA, PolyT), dinukleotydów i trinukleotydów. W oznaczeniu wykorzystano 6 unikalnych próbek. Uzyskane dane skompilowano w oparciu o poszczególne amplikony (**Tabela 11**) w celu oznaczenia wpływu zawartości materiału genetycznego na odsetek prawidłowych rozpoznań. Odsetek prawidłowych rozpoznań obejmuje rozpoznania wariantów i rozpoznania referencyjne i jest mniejszy niż 100% w przypadku wystąpienia nieprawidłowych rozpoznań lub braku rozpoznań. Warianty nie są rozpoznawane w przypadku niespełnienia warunków jednego lub większej liczby filtrów dla rozpoznania wariantu (np. niewystarczającego pokrycia). Nie stwierdzono nieprawidłowych rozpoznań. Liczba przypadków braku rozpoznania znacznie różniła się między poszczególnymi amplikonami. Najistotniejszymi predyktorami braku rozpoznania były zawartość GC oraz niektóre interakcje z zawartością GC. Na 2580 przypadków braku rozpoznania 2040 (79%) z nich wynikało z niespełnienia wymogów dotyczących pokrycia. Największą liczbą braków rozpoznań charakteryzowały się amplikony o zawartości GC większej niż 78%. Reprezentatywny amplikon o zawartości GC na

poziomie 78% dał w sumie 675 braków rozpoznań. Reprezentatywny amplikon o zawartości GC na poziomie 87% dał w sumie 1365 braków rozpoznań. Stopień pokrycia można zwiększyć, zmniejszając liczbę próbek wprowadzanych do komory przepływowej, co umożliwia wykrywanie amplikonów o wysokiej zawartości GC.

Tabela 11 Dane nt. dokładności na poziomie amplikonów

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,43 | 1245 | 0 | 0 | 100 |
| 19 | 3 | 49851331 | 49851400 | 70 | 70 | CT(3), indel | 0,49 | 1050 | 0 | 0 | 100 |
| 20 | 3 | 189713161 | 189713248 | 88 | 88 | PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3) | 0,41 | 1305 | 0 | 30 | 97,8 |
| 21 | 3 | 190106030 | 190106104 | 75 | 74 | Indel | 0,57 | 1108 | 0 | 2 | 99,8 |
| 22 | 4 | 2233667 | 2233744 | 78 | 78 | PolyA (6) | 0,26 | 1170 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 23 | 4 | 7780541 | 7780637 | 97 | 97 | PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5) | 0,42 | 1455 | 0 | 0 | 100 |
| 24 | 4 | 15688604 | 15688681 | 78 | 78 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 43 | 7 | 22202076 | 22202148 | 73 | 73 | Nd. | 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 | Nd. | 0,31 | 990 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 50 | 7 | 156476507 | 156476599 | 93 | 93 | Indel | 0,35 | 1395 | 0 | 0 | 100 |
| 51 | 8 | 1817312 | 1817394 | 83 | 83 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,49 | 1200 | 0 | 0 | 100 |
| 66 | 10 | 118351373 | 118351453 | 81 | 81 | Nd. | 0,51 | 1215 | 0 | 0 | 100 |
| 67 | 11 | 8159816 | 8159912 | 97 | 96 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 105 | 16 | 85706375 | 85706465 | 91 | 91 | PolyT (5), indel | 0,37 | 1362 | 0 | 3 | 99,8 |
| 106 | 17 | 3563920 | 3564008 | 89 | 89 | GC(3) | 0,64 | 1335 | 0 | 0 | 100 |
| 107 | 17 | 3594191 | 3594277 | 87 | 87 | PolyC (5), indel | 0,67 | 1303 | 0 | 2 | 99,8 |
| 108 | 17 | 3970090 | 3970180 | 91 | 91 | Indel | 0,46 | 1365 | 0 | 0 | 100 |
| 109 | 17 | 16084945 | 16085037 | 93 | 93 | Indel | 0,26 | 1395 | 0 | 0 | 100 |
| 110 | 17 | 33998759 | 33998849 | 91 | 89 | PolyT (5) | 0,54 | 1335 | 0 | 0 | 100 |
| 111 | 17 | 39589691 | 39589774 | 84 | 82 | PolyA (13), indel (x2) | 0,29 | 1215 | 0 | 78 | 94,0 |
| 112 | 17 | 41244394 | 41244484 | 91 | 91 | PolyA (5) | 0,34 | 1365 | 0 | 0 | 100 |
| 113 | 17 | 45438866 | 45438957 | 92 | 92 | PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel | 0,26 | 1365 | 0 | 15 | 98,9 |
| 114 | 17 | 61502432 | 61502510 | 79 | 79 | Indel | 0,41 | 1175 | 0 | 10 | 99,2 |
| 115 | 17 | 64023582 | 64023667 | 86 | 86 | PolyT (7) | 0,22 | 1289 | 0 | 1 | 99,9 |
| 116 | 17 | 72308237 | 72308320 | 84 | 84 | GAG(3) | 0,62 | 1260 | 0 | 0 | 100 |
| 117 | 18 | 2616456 | 2616522 | 67 | 67 | GA(3) | 0,31 | 1005 | 0 | 0 | 100 |
| 118 | 18 | 6980478 | 6980568 | 91 | 91 | Nd. | 0,37 | 1365 | 0 | 0 | 100 |
| 119 | 18 | 9888026 | 9888094 | 69 | 69 | PolyA (6), TG(3) | 0,43 | 1035 | 0 | 0 | 100 |
| 120 | 18 | 38836999 | 38837073 | 75 | 75 | PolyA (5), indel | 0,37 | 1121 | 0 | 19 | 98,3 |
| 121 | 18 | 47405382 | 47405462 | 81 | 81 | CTC(3), indel | 0,47 | 1215 | 0 | 0 | 100 |
| 122 | 18 | 54815665 | 54815749 | 85 | 85 | CT(3), indel | 0,45 | 1275 | 0 | 0 | 100 |
| 123 | 18 | 59773996 | 59774060 | 65 | 65 | Nd. | 0,48 | 975 | 0 | 0 | 100 |
| 124 | 19 | 625143 | 625241 | 99 | 99 | Nd. | 0,59 | 1478 | 0 | 7 | 99,5 |
| 125 | 19 | 18121418 | 18121491 | 74 | 74 | Nd. | 0,68 | 1110 | 0 | 0 | 100 |
| 126 | 19 | 18186574 | 18186643 | 70 | 70 | Nd. | 0,64 | 1050 | 0 | 0 | 100 |
| 127 | 20 | 746056 | 746149 | 94 | 94 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Początek amplikonu | Koniec amplikonu | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów |
|----------|-----------|--------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|
| 132 | 20 | 50897302 | 50897368 | 67 | 67 | Indel | 0,36 | 1005 | 0 | 6 | 99,4 |
| 133 | 20 | 62331904 | 62331994 | 91 | 88 | PolyG (6) | 0,73 | 1320 | 0 | 0 | 100 |
| 134 | 20 | 62690860 | 62690946 | 87 | 87 | Indel | 0,57 | 1305 | 0 | 0 | 100 |
| 135 | 21 | 30300823 | 30300888 | 66 | 66 | Indel | 0,35 | 990 | 0 | 0 | 100 |
| 136 | 21 | 33694176 | 33694273 | 98 | 98 | PolyT (6), CA(3) | 0,54 | 1470 | 0 | 0 | 100 |
| 137 | 21 | 36710706 | 36710792 | 87 | 87 | GT(3), indel | 0,39 | 1305 | 0 | 0 | 100 |
| 138 | 21 | 46644924 | 46644992 | 69 | 69 | PolyA (6), AG(3), indel | 0,32 | 1029 | 0 | 7 | 99,3 |
| 139 | 21 | 46705575 | 46705664 | 90 | 90 | PolyT (5), PolyA (6) | 0,5 | 1350 | 0 | 0 | 100 |
| 140 | 22 | 25750774 | 25750873 | 100 | 100 | Indel | 0,63 | 1500 | 0 | 1 | 99,9 |
| 141 | 22 | 32439233 | 32439329 | 97 | 97 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,52 | 1065 | 0 | 0 | 100 |
| 148 | Y | 2655397 | 2655461 | 65 | 0 | Nd. | 0,55 | 0 | 0 | 0 | Nd. |
| 149 | Y | 2655519 | 2655609 | 91 | 0 | Nd. | 0,48 | 0 | 0 | 0 | Nd. |
| 150 | Y | 2655609 | 2655679 | 71 | 0 | PolyA (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | Nd. |

Warianty, dla których stwierdzono brak rozpoznań, wymieniono w [Tabela 12](#). Filtry, których zastosowanie skutkowało brakiem rozpoznań, zostały wymienione w tabeli.

Tabela 12 Podsumowanie wariantów, dla których stwierdzono brak rozpoznania

| Nr amplikonu | Chr:Pozycja | Wariant | Zawartość odpowiedniego amplikonu | Filtr | Warianty pominięte | Warianty oczekiwane |
|--------------|-------------|---------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 28 | 5:1882129 | T > G | 78% GC | LowDP ¹ | 8 | 13 |
| 52 | 8:24811064 | AG > A | PolyG (7), CTC(4), 61% GC | R3x6 ² | 15 | 15 |
| 60 | 10:11784633 | C > T | PolyGC (3), 87% GC | LowDP | 13 | 13 |

| Nr amplikonu | Chr.Pozycja | Wariant | Zawartość odpowiedniego amplikonu | Filtr | Warianty pominięte | Warianty oczekiwane |
|--------------|-------------|---------|-----------------------------------|-------|--------------------|---------------------|
| 64 | 10:55892600 | TAC > T | AC(11), 42% GC | R3x6 | 9 | 9 |
| 111 | 17:39589692 | C > CA | PolyA (13), 29% GC | R3x6 | 13 | 13 |

¹ LowDP: Niskie pokrycie. Wariant jest odfiltrowywany, jeśli głębokość pokrycia w co najmniej jednej z pul w danej pozycji wynosi poniżej 900.

² R3x6: Ponownie zastosować filtr. Wariant jest odfiltrowywany, jeśli całość lub część sekwencji wariantu występuje powtarzalnie w genomie referencyjnym sąsiednio do pozycji wariantu. W oznaczeniu referencyjnym wymaganych jest co najmniej sześć powtórzeń, przy uwzględnieniu jedynie powtórzeń o długości nie większej niż 3 bp.

Wyniki sekwencjonowania próbki porównano z genotypem o wysokim poziomie ufności, ustalonym dla próbki NA12878 przez ośrodek NIST (National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Na sumaryczną liczbę 150 amplikonów 92 w pełni zawierało się w regionach genomu o wysokim poziomie ufności, 41 częściowo nakładało się na te regiony, natomiast 17 nie nakładało się na sekwencję NIST. W rezultacie dla każdego powtórzenia uzyskano 10 000 współrzędnych do porównań. Rozpoznane nukleotydy niewariantowe zostały porównane z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego. Wyniki oznaczeń dokładności zawiera [Tabela 13](#).

Tabela 13 Zgodność wyników rozpoznań nukleotydów przy użyciu aparatu MiSeqDx dla próbki GM12878 z bazy wzorców NIST

| Próbka | Liczba amplikonów | Średni odsetek rozpoznań | Całkowita liczba rozpoznań wariantów TP | Całkowita liczba rozpoznań wariantów FN | Całkowita liczba rozpoznań TN | Całkowita liczba rozpoznań FP | PPA | NPA | OPA |
|---------|-------------------|--------------------------|---|---|-------------------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|
| GM12878 | 150 | 98,43 | 206 | 0 | 19231 | 0 | 100 | 100 | 100 |

Pięć nierozcieńczonych próbek poddano dalszej analizie pod kątem rozpoznawania małych insercji i delecji (polimorfizmów typu indel) ([Tabela 14](#)). W niektórych przypadkach polimorfizmy typu indel były wspólne dla dwóch lub większej liczby próbek, co znalazło odzwierciedlenie w kolumnie „Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel”. Wyniki dla obu powtórzeń pięciu próbek podano w [Tabela 14](#). Stwierdzono w sumie 71 polimorfizmów typu indel o wielkości od 1 do 24 bp w przypadku insercji i od 1 do 25 bp w przypadku delecji. Wykryto 68 polimorfizmów typu indel ze zgodnością względną wyników dodatnich wynoszącą 1. Trzy insercje i delecje nie zostały prawidłowo rozpoznane, ponieważ żadnego z tych wariantów nie można było rozpoznać ze względu na filtr R3x6. Z tego powodu nie można było obliczyć wartości parametru PPA, którego definicja wyklucza brak rozpoznań. Te trzy warianty obejmowały delecję 1 bp (chr8 24811064 AG>A), delecję 2 bp (chr10 55892600 TAC>T) oraz insercję 1 bp (chr17 39589692 C>CA).

Tabela 14 Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel przy użyciu aparatu MiSeqDx

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|-----------|---------------------------------|---|-------------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 1 | 1 | 36450544 | 93 | Delecja 25 bp | GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 2 | 1 | 109465165 | 79 | Delecja 3 bp | ACTT>A | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 3 | 1 | 218353908 | 91 | Insercja 23 bp | T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 4 | 1 | 223906701 | 92 | Delecja 17 bp | GACAGACTGTGAGGAAGA>G | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 6 | 1 | 236372081 | 70 | Insercja 5 bp | C>CTTAAG | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 7 | 1 | 247812083 | 88 | Insercja 3 bp | C>CATG | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 8 | 2 | 55862804 | 90 | Insercja 7 bp | T>TTTGTTAA | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 9 | 2 | 87003972 | 80 | Delecja 6 bp | TTATCTC>T | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 13 | 2 | 200796749 | 87 | Insercja 5 bp | T>TTAAAA | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 14 | 2 | 212245090 | 91 | Insercja 12 bp | C>CTGAAAATAGGAT | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 16 | 2 | 235016388 | 73 | Insercja 2 bp | A>ATG | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 17 | 3 | 4466274 | 93 | Delecja 23 bp | TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 19 | 3 | 49851375 | 70 | Insercja 9 bp | C>CCTGGCTCCT | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 21 | 3 | 190106071 | 75 | Delecja 1 bp | AG>A | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 25 | 4 | 56236567 | 66 | Delecja 8 bp | TAACCGAAA>T | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 27 | 4 | 164446785 | 62 | Insercja 11 bp | T>TTATGGTATTGA | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 31 | 5 | 74077155 | 83 | Delecja 4 bp | TAGTA>T | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 34 | 5 | 155662255 | 75 | Insercja 8 bp | G>GCCTACTGA | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 36 | 6 | 24950035 | 92 | Delecja 21 bp | CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 37 | 6 | 31084942 | 100 | Delecja 3 bp | GCTT>G | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 39 | 6 | 32986905 | 95 | Delecja 25 bp | CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 41 | 6 | 41647442 | 95 | Delecja 23 bp | GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 44 | 7 | 66276142 | 88 | Insercja 1 bp | C>CT | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 46 | 7 | 110939983 | 85 | Delecja 4 bp | CAAGT>C | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 47 | 7 | 128533514 | 90 | Insercja 1 bp | T>TC | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|-----------|---------------------------------|---|------------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 48 | 7 | 149503916 | 91 | Delecja 4 bp | GGATA>G | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 50 | 7 | 156476548 | 93 | Delecja 11 bp | GAATCTGCACTT>G | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 52 | 8 | 24811064 | 90 | Delecja 1 bp | AG>A | 15 | 15 | 0 | 0 | Nd. |
| 53 | 8 | 76518677 | 67 | Insercja 4 bp | T>TACTG | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 55 | 9 | 105586193 | 65 | Insercja 4 bp | C>CAATT | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 58 | 9 | 138995370 | 97 | Delecja 21 bp | TCTGGGGGGCAGCCCTGAGGG>T | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 59 | 10 | 5987158 | 79 | Delecja 3 bp | TAAC>T | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 63 | 10 | 45084202 | 95 | Delecja 16 bp | AGCGTCTATAACCAAT>A | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 64 | 10 | 55892600 | 89 | Delecja 2 bp | TAC>T | 9 | 9 | 0 | 0 | 100 |
| 68 | 11 | 30177690 | 70 | Insercja 2 bp | C>CTG | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 70 | 11 | 59837721 | 62 | Insercja 8 bp | T>TTATGAAAA | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 75 | 11 | 118406328 | 85 | Delecja 8 bp | CAGTGTGGA>C | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 76 | 11 | 120357842 | 85 | Delecja 2 bp | CTT>C | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 78 | 12 | 2834814 | 84 | Insercja 21 bp | T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 84 | 13 | 25817002 | 89 | Insercja 19 bp | C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 85 | 13 | 44880152 | 89 | Insercja 4 bp | C>CCTGT | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 86 | 13 | 77665265 | 77 | Delecja 20 bp | ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 89 | 14 | 46958967 | 73 | Delecja 22 bp | TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 90 | 14 | 58050081 | 81 | Insercja 4 bp | C>CTGAT | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 91 | 14 | 82390602 | 91 | Delecja 16 bp | CTTGCTCTATAAACCGT>C | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 93 | 14 | 102808554 | 94 | Delecja 5 bp | CGTGGA>C | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 95 | 15 | 63446199 | 68 | Delecja 6 bp | CAAAT>C | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 96 | 15 | 77879862 | 95 | Delecja 25 bp | GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 98 | 15 | 85438311 | 72 | Insercja 3 bp | C>CTTG | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 100 | 15 | 89864316 | 70 | Insercja 4 bp | G>GCTAC | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 105 | 16 | 85706416 | 91 | Delecja 7 bp | ATTATTC>A | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |

| Amplikon | Chromosom | Pozycja | Rozmiar analizowanego fragmentu | Rodzaj i długość polimorfizmu typu indel w amplikonie | Indel | Całkowita liczba powtórzeń próbki z polimorfizmem typu indel | Liczba nierozpoznanych nukleotydów | Całkowita liczba nieprawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | Całkowita liczba prawidłowych rozpoznań polimorfizmów typu indel | PPA |
|----------|-----------|----------|---------------------------------|---|-----------------------------|--|------------------------------------|---|--|-----|
| 107 | 17 | 3594276 | 87 | Delecja 1 bp | TG>T | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 108 | 17 | 3970133 | 91 | Insercja 18 bp | A>ATCCTATTCTACTCTGAAT | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 109 | 17 | 16084985 | 93 | Insercja 4 bp | A>AACAC | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 111 | 17 | 39589692 | 84 | Insercja 1 bp | C>CA | 13 | 13 | 0 | 0 | 100 |
| 112 | 17 | 39589739 | 84 | Insercja 24 bp | T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 113 | 17 | 45438886 | 92 | Delecja 4 bp | CAGTG>C | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |
| 114 | 17 | 61502459 | 79 | Delecja 12 bp | TTGTATCTGCTG>T | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 120 | 18 | 38837054 | 75 | Insercja 22 bp | T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 121 | 18 | 47405425 | 81 | Insercja 3 bp | T>TGAG | 11 | 0 | 0 | 11 | 100 |
| 122 | 18 | 54815706 | 85 | Delecja 2 bp | ACT>A | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 130 | 20 | 21766863 | 70 | Delecja 15 bp | TACTTGAGAACTGAGG>T | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 131 | 20 | 25278464 | 101 | Insercja 5 bp | A>AGTGGG | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 132 | 20 | 50897361 | 67 | Insercja 11 bp | G>GGAATGTCAGCC | 15 | 0 | 0 | 15 | 100 |
| 134 | 20 | 62690925 | 87 | Delecja 16 bp | TCCTGGCTGGCCTGTGG>T | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 135 | 21 | 30300873 | 66 | Insercja 11 bp | G>GATAAACTTTA | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 137 | 21 | 36710749 | 87 | Delecja 21 bp | ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A | 9 | 0 | 0 | 9 | 100 |
| 138 | 21 | 46644985 | 69 | Delecja 5 bp | GTTGTT>G | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 140 | 22 | 25750814 | 100 | Insercja 6 bp | C>CAGGGCA | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 142 | 22 | 37409885 | 97 | Insercja 5 bp | C>CTGTTT | 13 | 0 | 0 | 13 | 100 |
| 144 | 22 | 47081407 | 92 | Delecja 10 bp | GGGCACAGGCA>G | 7 | 0 | 0 | 7 | 100 |

Badanie 2

W badaniu wykorzystano przechowywane w banku, utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE) próbki tkanki raka jelita grubego oraz reprezentatywne oznaczenie dwugenowe, które porównano z metodą referencyjną, tj. dwukierunkowym sekwencjonowaniem metodą Sangera (metoda Sangera). Wyniki otrzymane metodą Sangera i reprezentatywnego oznaczenia dwugenowego potwierdzono u 441 z łącznej liczby 1183 uczestników. W ocenie na poziomie poszczególnych uczestników (Tabela 15) u 230 spośród 441 uczestników uzyskano dodatni wynik metodą Sangera (mutacja wykryta metodą Sangera). U 227 uczestników z tej

liczby uzyskano dodatni wynik oznaczenia reprezentatywnego. U pozostałych 211 spośród 441 uczestników uzyskano ujemny wynik metodą Sangera. U 206 uczestników z tej liczby uzyskano ujemny wynik oznaczenia reprezentatywnego. Oznacza to, że uzyskano procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) na poziomie 98,7% i procentową zgodność wyników ujemnych (NPA) na poziomie 97,6% (Tabela 15).

Tabela 15 Procentowa zgodność wyników dodatnich i ujemnych na poziomie poszczególnych uczestników

| Oznaczenie reprezentatywne | Metoda Sangera | | Łącznie |
|----------------------------|------------------|--------|---------|
| | Dodatnie | Ujemne | |
| Dodatnie | 227 ¹ | 5 | 232 |
| Ujemne | 3 ² | 206 | 209 |
| Łącznie | 230 | 211 | 441 |

| Performance (Wynik) Podsumowanie | | |
|----------------------------------|--------------------|------------------|
| Odsetek zgodności Statystyka | Estymator punktowy | Dokładna 95% CI* |
| PPA | 227/230 = 98,7% | [96,2%, 99,7%] |
| NPA | 206/211 = 97,6% | [94,6%, 99,2%] |

¹ Stwierdzono 224 dokładne dopasowania dla wyników na poziomie wszystkich mutacji u poszczególnych uczestników. U dwóch uczestników w oznaczeniu MiSeqDx wykryto mutację wykrytą metodą Sangera i jedną dodatkową mutację. U jednego uczestnika w oznaczeniu MiSeqDx i oznaczeniu metodą Sangera wykryto różne mutacje.

² U jednego uczestnika wykryto dwie mutacje metodą Sangera. U dwóch uczestników wykryto jedną mutację metodą Sangera.

Badanie 3

W badaniu oceniano biblioteki DNA przygotowane z preparatów FFPE o różnych rodzajach tkanek. Łącznie wykorzystano 109 preparatów FFPE z ośmiu różnych tkanek (jelito grube, jajnik, trzustka, nadnercze, pęcherz moczowy, wątroba, tarczyca i sutek) z co najmniej 11 preparatami FFPE każdego rodzaju tkanki. W tkance nadnercza obecne były przerzuty z nowotworów przetyku, płuca i jelita grubego. Pozostałe tkanki zawierały guzy pierwotne. W tym badaniu użyto oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania 26 genów obejmujących 21 577 nukleotydów znajdujących się w 17 różnych chromosomach. Metodą Sangera zsekwencjonowano sześć różnych genów (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* i *BRAF*), przy czym każdy z guzów zawierał od 1 do 3 genów

zsekwencjonowanych metodą Sangera w oparciu o spodziewane występowanie właściwych dla niego mutacji somatycznych. Za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera zidentyfikowano 39 mutacji somatycznych typu SNV w 33 spośród 109 preparatów FFPE. Aparat MiSeqDx zidentyfikował 36 mutacji somatycznych typu SNV w 32 spośród 109 preparatów FFPE, przy jednym wyniku fałszywie ujemnym i braku rozpoznania dwóch pozycji wariantowych. Parametr PPA wyniósł 97,3%. Aparat MiSeqDx zidentyfikował 78 975 referencyjnych nukleotydów w 109 preparatach FFPE, przy 29 wynikach fałszywie dodatnich w stosunku do rezultatów sekwencjonowania metodą Sangera i 3416 brakach rozpoznań. Parametr NPA wyniósł 99,9%. Dla obu metod stwierdzono zgodność w zakresie delecji dwóch nukleotydów. W [Tabela 16](#) podsumowano wyniki w zależności od rodzaju tkanki.

Tabela 16 Procentowa zgodność wyników dodatnich i ujemnych w zależności od rodzaju tkanki

| Rodzaj tkanki | Liczba próbek | Całkowita liczba wariantów | Całkowita liczba wariantów TP | Całkowita liczba wariantów FN | Całkowita liczba rozpoznań TN | Całkowita liczba rozpoznań FP | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | PPA | NPA |
|---------------|---------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|------|---------|
| Nadnercze | 16 | 6 | 4 | 1 | 11823 | 2 | 607 | 80 | > 99,9 |
| Pęcherz | 12 | 4 | 4 | 0 | 7070 | 3 | 273 | 100 | > 99,9 |
| Pierś | 16 | 3 | 3 | 0 | 13439 | 7 | 479 | 100 | 99,9 |
| Jelito grube | 11 | 6 | 5 | 0 | 8720 | 2 | 133 | 100 | > 99,9 |
| Wątroba | 13 | 3 | 3 | 0 | 7984 | 1 | 59 | 100 | > 99,9 |
| Jajnik | 13 | 7 | 7 | 0 | 10581 | 1 | 724 | 100 | > 99,99 |
| Trzustka | 17 | 7 | 7 | 0 | 11929 | 12 | 489 | 100 | 99,9 |
| Tarczycyca | 11 | 3 | 3 | 0 | 7429 | 1 | 652 | 100 | > 99,9 |
| Łącznie | 109 | 39 | 36 | 1 | 78975 | 29 | 3416 | 97,3 | > 99,9 |

Odtwarzalność

Przeprowadzono dwa badania mające na celu ocenę odtwarzalności wykonywanych w aparacie MiSeqDx oznaczeń DNA wyodrębnionego z próbek FFPE. W badaniu 1 wykorzystywano wiele aparatów. W badaniu 2 wykorzystywano wiele stanowisk.

Badanie 1

Odtwarzalność oznaczeń przy użyciu aparatu MiSeqDx wyznaczano przy użyciu dwóch aparatów i dwóch wyszkolonych operatorów w całkowitej liczbie ośmiu przebiegów. Oznaczenie reprezentatywne, kontekst genomowy amplikonów, próbki i metoda referencyjna były takie same, jak opisane powyżej dla badania dokładności 1. Wyniki przedstawiono w podziale na poszczególne amplikony dla każdego z aparatów ([Tabela 17](#)) tak, by wykazać odtwarzalność rozpoznań na różnych aparatach. Odsetek prawidłowych rozpoznań

wyznaczano po uwzględnieniu zarówno nieprawidłowych rozpoznań, jak i braku rozpoznań (niespełnienia jednego lub większej liczby filtrów rozpoznawania wariantów). Oba aparaty charakteryzowały się podobną liczbą braków rozpoznań dla poszczególnych ampliconów. W przypadku MiSeqDx 1 zaobserwowano pojedyncze nieprawidłowe rozpoznanie w regionie pewnym, zgodnie ze standardem referencyjnym genomów platynowych. Nieprawidłowe rozpoznanie było fałszywie dodatnim rozpoznaniem wariantu insercyjnego w ampliconie 64 dotyczącym chromosomu 10 w pozycjach od 55892599 do 55892687. Amplicon zawierał 11 kolejnych powtórzeń jednego dinukleotydu.

Tabela 17 Badanie – wyniki odtwarzalności badań między aparatami MiSeqDx (na poziomie ampliconu)

| Amplicon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny ampliconu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 14 | 2 | 91 | 91 | PolyT (5), PolyA (6), indel | 0,3 | 5453 | 0 | 7 | 5449 | 0 | 11 |
| 15 | 2 | 93 | 93 | Nd. | 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 | Nd. | 0,43 | 4980 | 0 | 0 | 4980 | 0 | 0 |
| 19 | 3 | 70 | 70 | CT(3), indel | 0,49 | 4193 | 0 | 7 | 4194 | 0 | 6 |
| 20 | 3 | 88 | 88 | PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3) | 0,41 | 5220 | 0 | 120 | 5220 | 0 | 120 |
| 21 | 3 | 75 | 74 | Indel | 0,57 | 4432 | 0 | 8 | 4432 | 0 | 8 |
| 22 | 4 | 78 | 78 | PolyA (6) | 0,26 | 4676 | 0 | 4 | 4676 | 0 | 4 |
| 23 | 4 | 97 | 97 | PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5) | 0,42 | 5820 | 0 | 0 | 5820 | 0 | 0 |
| 24 | 4 | 78 | 78 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,39 | 3840 | 0 | 0 | 3840 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplitonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | PolyT (5), TCT(3), CTT(3) | 0,55 | 5820 | 0 | 60 | 5820 | 0 | 60 |
| 39 | 6 | 95 | 95 | Indel | 0,53 | 5697 | 0 | 3 | 5698 | 0 | 2 |
| 40 | 6 | 86 | 86 | PolyC (6) | 0,7 | 5159 | 0 | 1 | 5160 | 0 | 0 |
| 41 | 6 | 95 | 94 | PolyG (5), indel | 0,61 | 5638 | 0 | 2 | 5638 | 0 | 2 |
| 42 | 6 | 91 | 91 | PolyA (5) | 0,44 | 5460 | 0 | 0 | 5460 | 0 | 0 |
| 43 | 7 | 73 | 73 | Nd. | 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 | Nd. | 0,31 | 3960 | 0 | 0 | 3960 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 50 | 7 | 93 | 93 | Indel | 0,35 | 5580 | 0 | 0 | 5579 | 0 | 1 |
| 51 | 8 | 83 | 83 | Nd. | 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 | Nd. | 0,49 | 5760 | 0 | 0 | 5760 | 0 | 0 |
| 57 | 9 | 83 | 83 | AT(3) | 0,37 | 4973 | 0 | 7 | 4978 | 0 | 2 |
| 58 | 9 | 97 | 97 | PolyC (6), indel | 0,68 | 5817 | 0 | 3 | 5818 | 0 | 2 |
| 59 | 10 | 79 | 78 | PolyG (5), indel | 0,47 | 4679 | 0 | 1 | 4680 | 0 | 0 |
| 60 | 10 | 98 | 91 | GC(3) | 0,87 | 450 | 0 | 5010 | 632 | 0 | 4828 |
| 61 | 10 | 79 | 79 | PolyT (5) | 0,3 | 4740 | 0 | 0 | 4740 | 0 | 0 |
| 62 | 10 | 90 | 90 | PolyA (5), PolyT (5) | 0,2 | 5400 | 0 | 0 | 5400 | 0 | 0 |
| 63 | 10 | 95 | 95 | 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 | Nd. | 0,49 | 4800 | 0 | 0 | 4800 | 0 | 0 |
| 66 | 10 | 81 | 81 | Nd. | 0,51 | 4860 | 0 | 0 | 4860 | 0 | 0 |
| 67 | 11 | 97 | 96 | Nd. | 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 | Nd. | 0,65 | 5999 | 0 | 1 | 5998 | 0 | 2 |
| 70 | 11 | 62 | 62 | Indel | 0,37 | 3720 | 0 | 0 | 3720 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplitonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 71 | 11 | 102 | 102 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | PolyA (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 | Nd. | 0,49 | 4860 | 0 | 0 | 4860 | 0 | 0 |
| 81 | 12 | 71 | 71 | PolyA (6) | 0,35 | 4260 | 0 | 0 | 4260 | 0 | 0 |
| 82 | 2 | 95 | 95 | PolyG (5) | 0,68 | 5605 | 0 | 95 | 5605 | 0 | 95 |
| 83 | 13 | 73 | 73 | Nd. | 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 | Nd. | 0,25 | 4980 | 0 | 0 | 4980 | 0 | 0 |
| 89 | 14 | 73 | 72 | PolyT (5), indel | 0,19 | 4173 | 0 | 147 | 4173 | 0 | 147 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,27 | 3780 | 0 | 0 | 780 | 0 | 0 |
| 102 | 16 | 95 | 95 | PolyC (5) | 0,67 | 5700 | 0 | 0 | 5700 | 0 | 0 |
| 103 | 16 | 87 | 87 | TA(3) | 0,41 | 5220 | 0 | 0 | 5220 | 0 | 0 |
| 104 | 16 | 104 | 104 | PolyC (5) | 0,67 | 6238 | 0 | 3 | 6238 | 0 | 3 |
| 105 | 16 | 91 | 91 | PolyT (5), indel | 0,37 | 5443 | 0 | 17 | 5444 | 0 | 16 |
| 106 | 17 | 89 | 89 | GC(3) | 0,64 | 5251 | 0 | 89 | 5339 | 0 | 1 |
| 107 | 17 | 87 | 87 | PolyC (5), indel | 0,67 | 5212 | 0 | 8 | 5212 | 0 | 8 |
| 108 | 17 | 91 | 91 | 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 | PolyA (13), indel (x2) | 0,29 | 4860 | 0 | 308 | 4860 | 0 | 07 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,48 | 3900 | 0 | 0 | 3900 | 0 | 0 |
| 124 | 19 | 99 | 99 | Nd. | 0,59 | 5926 | 0 | 14 | 5924 | 0 | 16 |
| 125 | 19 | 74 | 74 | Nd. | 0,68 | 4440 | 0 | 0 | 4438 | 0 | 2 |
| 126 | 19 | 70 | 70 | Nd. | 0,64 | 4199 | 0 | 1 | 4200 | 0 | 0 |
| 127 | 20 | 94 | 94 | Nd. | 0,61 | 5640 | 0 | 1 | 5638 | 0 | 3 |
| 128 | 20 | 82 | 82 | AC(3) | 0,59 | 4920 | 0 | 0 | 4920 | 0 | 0 |
| 129 | 20 | 76 | 76 | CT(3) | 0,58 | 4559 | 0 | 1 | 4558 | 0 | 2 |
| 130 | 20 | 70 | 70 | GT(3), TG(4), indel | 0,46 | 4200 | 0 | 0 | 4200 | 0 | 0 |

| Amplikon | Chromosom | Rozmiar analizowanego fragmentu | Zasady w regionach wysokiej ufności | Materiał genetyczny amplikonu | Zawartość GC | MiSeqDx 1 | | | MiSeqDx 2 | | |
|----------|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---|--|---|---|--|---|
| | | | | | | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba prawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nieprawidłowo rozpoznanych nukleotydów | Łączna liczba nierozpoznanych nukleotydów |
| 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 | Nd. | 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 | Nd. | 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 | Nd. | 0,52 | 4260 | 0 | 0 | 4260 | 0 | 0 |
| 148 | Y | 65 | 0 | Nd. | 0,55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 149 | Y | 91 | 0 | Nd. | 0,48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | Y | 71 | 0 | PolyA (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Wyniki badania odtwarzalności analizowano dla poszczególnych operatorów w oparciu o częstość wariantów (Tabela 18). Analiza wykazała spójność częstości wariantów wykrywanych przez operatorów. Przedstawiono wartości średniej częstości wariantu +/- 1 odchylenie standardowe.

Tabela 18 Wyniki oznaczeń przy użyciu aparatu MiSeqDx dokonywanych przez poszczególnych operatorów

| Zakres częstości wariantu | Liczba unikalnych wariantów | Całkowita liczba wariantów analizowanych przez operatora 1 | Całkowita liczba wariantów analizowanych przez operatora 2 | Średnia (SD) częstość wariantu raportowana przez operatora 1 | Średnia (SD) częstość wariantu raportowana przez operatora 2 |
|---------------------------|-----------------------------|--|--|--|--|
| Wysoka częstość (~100%) | 1112 | 1072 | 1072 | 0,96 +/- 0,05 | 0,96 +/- 0,05 |
| Średnia częstość (~50%) | 3240 | 3151 | 3161 | 0,49 +/- 0,04 | 0,49 +/- 0,04 |
| Niska częstość (3-7%) | 620 | 618 | 612 | 0,05 +/- 0,01 | 0,05 +/- 0,01 |

Wyniki badania odtwarzalności dla poszczególnych próbek zawierają dane ze wszystkich ośmiu przebiegów (Tabela 19). Wykrywalność ocenia się oddzielnie dla każdego rodzaju wariantu – SNV, insercji i delecji. Pozycje referencyjne wyklucza się. Analiza wykazała, że uzyskane wyniki dotyczące wariantów były powtarzalne we wszystkich próbkach.

Tabela 19 Zgodność wyników rozpoznawania nukleotydów przez aparat MiSeqDx w zależności od próbki

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

¹ Warianty z częstością większą niż 20%.

² Warianty z częstością mniejszą niż 20%.

Dane uzyskane w oparciu o 8 przebiegów w przedstawionym badaniu odtwarzalności potwierdzają twierdzenie, że aparat MiSeqDx jest w stanie w sposób spójny sekwencjonować:

- Zawartość GC \geq 19% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 120 ze 120 sekwencjonowanych amplikonów z 19% zawartością GC rozpoznane prawidłowo z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 3,4%).
- Zawartość GC \leq 73% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 120 ze 120 sekwencjonowanych amplikonów z 73% zawartością GC rozpoznane prawidłowo z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 0,1%).
- Łańcuchy PolyA o długości \leq 8 (powtórzenie PolyA złożone z 8 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 120 ze 120 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyA = 8).
- Łańcuchy PolyT o długości \leq 10 (powtórzenie PolyT złożone z 10 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 120 ze 120 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyT = 10).
- Łańcuchy PolyG o długości \leq 6 (powtórzenie PolyG złożone z 6 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 720 z 720 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyG = 6).
- Łańcuchy PolyC o długości \leq 6 (powtórzenie PolyC złożone z 6 nukleotydów rozpoznane prawidłowo w 359 z 360 sekwencjonowanych amplikonów zawierających PolyC = 6, 1 brak rozpoznania).

- Powtórzenia dinukleotydydowe o długości $\leq 4x$ (wszystkie zidentyfikowane nukleotydy z 4-krotnym powtórzeniem dinukleotydu w 600 z 600 sekwencjonowanych amplikonów zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0,4%).
- Powtórzenia trinukleotydydowe o długości $\leq 5x$ (wszystkie zidentyfikowane nukleotydy z 5-krotnym powtórzeniem trinukleotydu w 120 ze 120 sekwencjonowanych amplikonów zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 1,9%).
- Insercje 24 lub mniej nukleotydów i delecje 25 lub mniej nukleotydów:
 - insercje 24 nukleotydów zidentyfikowane prawidłowo w 120 ze 120 próbek,
 - delecje 25 nukleotydów zidentyfikowane poprawnie w 182 próbkach przy 2 próbkach na 184 próbki oznaczonych jako brak rozpoznania.

Badanie 2

Wykonano zewnętrzne badanie mające na celu ocenę odtwarzalności reprezentatywnego oznaczenia dwugenowego, opisane jako badanie dokładności 2, które przeprowadzono w trzech zewnętrznych ośrodkach badawczych (dwóch operatorów w każdym ośrodku), używając jednej serii odczynników, w trzech nienastępujących po sobie dniach. Badanie prowadzono, wykorzystując sześć dobrze scharakteryzowanych paneli próbek genomowego DNA z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie preparatów klinicznych lub linii komórkowych. Każdy panel składał się z 10 elementów, co w sumie dało 60 elementów we wszystkich panelach.

Te 60 elementów paneli obejmowało duplikaty czterech próbek z unikalnym typem dzikim (dla mutacji panelowych), 12 próbek z unikalną mutacją (o pojedynczej mutacji) przygotowanych w wersjach z wysoką i niską częstością mutacji oraz dwóch próbek z unikalną mutacją (o pojedynczej mutacji) przygotowanych wyłącznie w wersji o niskiej częstości mutacji. Każdy unikalny preparat (próbka) o danej częstości mutacji (w każdej serii oznaczany w duplikatach) mógł dostarczyć 36 wyników (2 powtórzenia \times 2 operatorów \times 3 dni \times 3 ośrodki), pod warunkiem że wszystkie oznaczenia były ważne.

Dokonano oceny oczekiwanego odsetka rozpoznanych nukleotydów (PEC, ang. Percent Expected Call) dla wszystkich wariantów dodatnich i ujemnych, porównując wynik oznaczenia reprezentatywnego z oczekiwanym wynikiem mutacji (oczekiwanym wykryciem lub niewykryciem mutacji) w każdej próbce. Wartość PEC oblicza się jako 100% pomnożone przez liczbę oczekiwanych rozpoznań podzieloną przez liczbę podjętych prób rozpoznania. Dwustronny 95-procentowy przedział ufności oblicza się metodą punktacji Wilsona.

Dla połączonych ośrodków odsetki powodzeń wyniosły $\geq 94,7\%$ dla pierwszego przebiegu próbki, tj. próbek testowanych w przebiegach uznanych za ważne za pierwszym razem. Wartość PEC na poziomie mutacji dla wszystkich zmutowanych próbek wyniosła 99,6% (905/909) (95% CI; 98,9, 99,8). Liczba prób rozpoznania podjętych dla wszystkich 56 mutacji (niezależnie od tego, czy wykryta mutacja była oczekiwana czy też nie) we wszystkich ważnych próbkach wyniosła 58 856 (56 \times 1051). Wśród wymienionych wyżej

58 856 obserwacji na poziomie mutacji stwierdzono tylko sześć przypadków niezgodności między wynikiem obserwowanym a oczekiwanym. Wartość PEC na poziomie mutacji dla wszystkich dodatnich i ujemnych wariantów wszystkich elementów paneli – zarówno z mutacją, jak i typu dzikiego – wyniosła 99,99% (58 850/58 856).

Czułość analityczna (granica próby ślepej (LoB) i granica wykrywalności (LoD))

W tym badaniu zweryfikowano próg odcięcia oznaczenia dla urządzenia MiSeqDx z zastosowaniem reprezentatywnego panelu i wyznaczono granicę wykrywalności (LoD, ang. Limit of Detection). Krótko mówiąc, dobrze scharakteryzowane linie komórkowe Platinum Genome GM12878 i GM12877 utrwalono w formalinie i zatopiono w parafinie, po czym dokonano ekstrakcji DNA. GM12878 rozcieńczono GM12877 w taki sposób, by częstość występowania wariantu dla 70 wariantów (52 SNV, 9 insercji i 9 delecji) była bliska 0,05. Dwie próbki DNA były badane przez dwóch operatorów przy użyciu dwóch aparatów i dwóch serii odczynników; w sumie przy użyciu aparatu MiSeqDx wykonano 10 przebiegów sekwencjonowania. W rezultacie przy użyciu każdej serii odczynników uzyskano 40 powtórzeń dla każdego wariantu GM12878 i 60 powtórzeń dla każdej odpowiadającej im współrzędnej typu dzikiego w GM12877. Wartości granicy próby ślepej (LoB) i granicy wykrywalności (LoD) obliczono przy użyciu klasycznego podejścia przedstawionego w dokumencie EP17-A2 Instytutu Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI) z wykorzystaniem opcji nieparametrycznej. Wartości LoB i LoD obliczano oddzielnie dla SNV, insercji i delecji, sumując częstości występowania wariantów danego rodzaju. Prawdopodobieństwo błędu pierwszego rodzaju wyznaczono na 0,01, zaś prawdopodobieństwo błędu drugiego rodzaju wyznaczono na 0,05.

Dla LoB zsumowane częstości występowania wariantów posortowano od najniższej do najwyższej, wyznaczając 99. pozycję w rankingu dla każdej serii odczynnika i dla każdego rodzaju wariantu (Tabela 20). W oprogramowaniu MiSeqDx do jakościowego wykrywania wariantów stosuje się próg odcięcia (efektywną wartość LoB) odpowiadający częstości wariantu na poziomie 0,026. W oparciu o obliczone granice próby ślepej potwierdzono, że ww. próg prowadzi do błędu pierwszego rodzaju z prawdopodobieństwem nie większym niż 0,01.

Tabela 20 Granica próby ślepej

| Rodzaj wariantu | Całkowita liczba częstości wariantu | LoB dla odczynnika z serii 1 (%) | LoB dla odczynnika z serii 2 (%) |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| SNV | 3120 | 0,87 | 0,75 |
| Insercja | 540 | 0,79 | 0,60 |
| Delecja | 540 | 0,96 | 0,84 |

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności (LoD) dla każdej serii odczynników i dla każdego rodzaju wariantu obliczono odsetek częstości poszczególnych mutacji plasujący się poniżej punktu odcięcia wynoszącego 0,026 (Tabela 21). Ponieważ te odsetki były

niższe niż prawdopodobieństwo popełnienia błędu drugiego rodzaju wynoszące 5% (0,05), jako granicę wykrywalności obliczono medianę połączonych częstości występowania wariantów (Tabela 21). Za wartość LoD dla każdego rodzaju wariantu przyjęto większą spośród dwóch wartości obliczonych dla dwóch serii odczynników: 5,45% dla SNV, 4,88% dla insercji i 5,44% dla delecji.

Tabela 21 Granica wykrywalności

| Seria odczynnika | Rodzaj wariantu | Całkowita liczba częstości wariantu | Liczba pomiarów częstości wariantów <2,6% | Odsetek pomiarów częstości wariantów <2,6% | Granica wykrywalności (%) |
|------------------|-----------------|-------------------------------------|---|--|---------------------------|
| 1 | SNV | 2080 | 4 | 0,20 | 5,45 |
| | Insercja | 360 | 0 | 0,00 | 4,86 |
| | Delecja | 360 | 2 | 0,60 | 5,44 |
| 2 | SNV | 2080 | 26 | 1,30 | 5,44 |
| | Insercja | 360 | 0 | 0,00 | 4,88 |
| | Delecja | 360 | 0 | 0,00 | 5,24 |

Przedstawione poniżej badania ilustrują cechy wydajności aparatu MiSeqDx z innym reprezentatywnym oznaczeniem kierowanym na 56 mutacji w dwóch istotnych klinicznie genach odpowiedzialnych za powstawanie nowotworów (panel mutacji). Panel mutacji został zaprojektowany do swoistego wykrywania 56 mutacji w dwóch klinicznie istotnych genach odpowiedzialnych za powstawanie nowotworu (gen 1 i gen 2). Oznaczenie umożliwia równoczesne stwierdzenie obecności lub braku każdej z 56 mutacji we wszystkich sekwencjonowanych próbkach. Metodą referencyjną dla przedstawionych badań było dwukierunkowe sekwencjonowanie metodą Sangera.

Precyzja oznaczeń między seriami

W celu zbadania cech wydajności aparatu MiSeqDx dla różnych serii produkcyjnych zestawów odczynników (obejmujących odczynniki do kwalifikacji próbek, przygotowywania bibliotek i sekwencjonowania) przeprowadzono badanie precyzji oznaczeń między seriami w oparciu o dwugenowe oznaczenie reprezentatywne przy użyciu panelu pięciu zmieszanych preparatów FFPE spełniających wymagania kwalifikacyjne dla próbek. Każdy preparat FFPE zawierał dwie unikalne mutacje: jedną obecną na niższym (ok. 8%), zaś drugą na wyższym (ok. 14%) poziomie częstości. W trzech nienastępujących po sobie dniach przy użyciu trzech różnych serii zestawów odczynników wykonano po dwanaście (12) obserwacji każdej z pięciu mieszanin preparatów. Całkowita liczba obserwacji dla wszystkich serii odczynników wyniosła 180 we wszystkich mieszaninach preparatów i 360 dla wszystkich poziomów częstości występowania mutacji. W odniesieniu do wszystkich serii i dni oznaczeń oczekiwany wynik oznaczenia mutacji uzyskano w 99,7% (359/360) obserwacji. Jedną mutację o niskiej częstości nieprawidłowo rozpoznano jako typ dziki. W celu oszacowania zmienności

układu wykonano analizę komponentów wariacyjnych dla każdej mutacji/poziomu częstości mutacji. Całkowite odchylenie standardowe mieściło się w zakresie od 0,011 do 0,029. Wartość komponentu całkowitego odchylenia standardowego, za który odpowiadała seria odczytnika, mieściła się w zakresie od 0 do 0,015.

Historia wersji

| Nr dokumentu | Data | Opis zmiany |
|-----------------------------------|------------------------|---|
| Nr dokumentu 200006218 wer. 02 | Październik 2023 r. | Zaktualizowano odniesienia do oprogramowania Local Run Manager dla wersji 4. Zaktualizowano etykietę, aby dodać dane australijskiego sponsora. Poprawiono rozbieżności występujące w przypadku, gdy ulotka dołączona do opakowania różni się od raportu z badania weryfikacyjnego MiSeqDx. |
| Nr dokumentu 200006218 wer. 01 | Maj 2022 r. | Dodano numer katalogowy ulotki dołączonej do opakowania zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro w części Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane. Dodano informacje o testach z użyciem zestawu odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro w części Charakterystyka działania. Usunięto przestrożę dotyczącą Stanów Zjednoczonych z części Ostrzeżenia i środki ostrożności. |
| Nr dokumentu 200006218 wer. 00 | Listopad 2021 r. | Pierwsze wydanie do obsługi wersji 4.0 Oprogramowanie MOS i wersji 3.0 Lokalny menedżer przebiegu. |

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane w innych celach i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2023 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem www.illumina.com/company/legal.html.

Dane do kontaktu



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Sponsor w Australii

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

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w legendzie symboli dostępnej na stronie support.illumina.com, na karcie *Documentation* (Dokumentacja) danego zestawu.