

# Прибор MiSeq™ Dx Instrument

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO  
ТОЛЬКО ДЛЯ ЭКСПОРТА

## Предусмотренное применение

Прибор MiSeqDx предназначен для таргетного секвенирования библиотек ДНК, полученных из геномной ДНК человека, выделенной из цельной периферической крови или из зафиксированной формалином и залитой парафином (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) ткани. Эти библиотеки используются в ходе проводимых на приборе анализов для диагностики *in vitro* (IVD, *in vitro* diagnostic). Прибор MiSeqDx не предназначен для полногеномного секвенирования или секвенирования *de novo*. При работе на приборе MiSeqDx следует использовать зарегистрированные и представленные в каталоге, прошедшие проверку или одобренные к применению реагенты для диагностики *in vitro* и аналитическое программное обеспечение.

## Принципы проведения процедуры

Прибор MiSeqDx Instrument компании Illumina предназначен для таргетного ресеквенирования ДНК человека с использованием расходных материалов для секвенирования от компании Illumina и библиотек, полученных из геномной ДНК человека, выделенной из цельной периферической крови или ткани, зафиксированной формалином и залитой парафином (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded). Процесс проводится при использовании зарегистрированных и представленных в каталоге, прошедших проверку или одобренных к применению реагентов для диагностики *in vitro*. Библиотеки готовят посредством целенаправленной амплификации и добавления образцов, несущих различные индексные последовательности, а также добавления последовательностей для захвата. Библиотеки образцов иммобилизируют в проточной ячейке и секвенируют на приборе с помощью проприетарных реагентов и химических процессов, используемых при проведении секвенирования путем синтеза (SBS, sequencing by synthesis). При проведении SBS с помощью проприетарных реагентов и химических процессов применяется метод, основанный на использовании обратимых терминаторов, который позволяет обнаруживать однонуклеотидные основания по мере их встраивания в растущие нити ДНК. Программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA) выполняет анализ изображений и определение последовательности нуклеотидов, а также присваивает показатель качества каждому распознанному основанию в каждом цикле секвенирования. После завершения первичного анализа в ходе вторичного анализа на приборе MiSeqDx обрабатываются данные, полученные в результате распознавания оснований.

Обработка, как правило, включает демультимплексирование, формирование файлов FASTQ, выравнивание, определение вариантов, отличающихся от референсной последовательности, и создание файлов в формате определения вариантов (VCF, variant call format), содержащих информацию о вариантах, обнаруженных в определенных позициях референсного генома. В зависимости от рабочего процесса для вторичного анализа на приборе MiSeqDx используются различные модули.

## Конфигурация многовариантной загрузки

Конфигурация с многовариантной загрузкой включает аппаратное обеспечение, программное обеспечение и процедуры установки, позволяющие прибору MiSeqDx выполнять анализы секвенирования как для диагностики *in vitro* (IVD, *in vitro* diagnostic), так и в научно-исследовательских целях (RUO, *research use only*). Конфигурация с многовариантной загрузкой позволяет пользователю переключаться между диагностическим и научно-исследовательским режимом прибора. Радиочастотная идентификация (RFID, *radio-frequency identification*) расходных материалов для секвенирования не позволяет использовать в ходе диагностических запусков секвенирования реагенты, предназначенные для секвенирования в режиме RUO.

## Ограничения процедуры

- Предназначено для диагностики *in vitro*.
- Результаты, представленные на маркировке, получены для репрезентативных панелей образцов для анализа, составленных с использованием цельной периферической крови или клеточных линий для определения рабочих характеристик модуля Germline, а также с использованием зафиксированной формалином и залитой парафином (FFPE) ткани или FFPE клеточных линий для определения рабочих характеристик модуля Somatic; эти результаты получены при применении описанных реагентов и модулей программного обеспечения. Модули Germline Variant Module и Somatic Variant Module были разработаны для оценки рабочих характеристик при проведении анализов репрезентативных образцов. Рабочие характеристики представлены исключительно в информационных целях. Приведенное валидационное испытание служит исключительно для иллюстрации возможностей прибора в целом; его результаты не следует трактовать как доказательство возможностей прибора или приемлемости его использования для подтверждения каких-либо конкретных заявлений. Для всех диагностических тестов, разработанных для выполнения на этом приборе, необходима полная валидация в отношении всех аспектов работы.
- Параметры, ограничивающие работу данного прибора:
  - Выходные данные секвенирования  $\geq 5$  Гб при длине прочтения  $2 \times 150$  п. о.
  - Прочтения, проходящие через фильтр,  $\geq 15$  миллионов при длине прочтения  $2 \times 150$  п. о.

- Основания с показателем качества выше Q30;  $\geq 80$  % при длине прочтения  $2 \times 150$  п. о. Минимум у 80 % оснований показатели качества по шкале Фреда  $\geq 30$ , что указывает на точность распознавания оснований выше 99,9 %.
- Прибор MiSeqDx был валидирован только в отношении секвенирования библиотек ДНК человека, выделенных из цельной периферической крови или FFPE тканей. При работе на этом приборе для диагностики *in vitro* не следует использовать библиотеки, полученные из образцов других типов. Рабочие характеристики настоящего прибора при секвенировании микробных или вирусных нуклеиновых кислот, выделенных из клинических образцов, не установлены.
- Прибор MiSeqDx предназначен для диагностики *in vitro* при использовании зарегистрированных и представленных в каталоге, прошедших проверку или одобренных к применению реагентов или методов анализа IVD. Ограничения, применимые к реагентам, и рабочие характеристики, описанные в настоящем листке-вкладыше, основаны на анализах репрезентативных образцов и характеристиках модулей программного обеспечения. Информация о предусмотренном применении, определяемых вариациях и типе образцов, касающаяся анализов IVD, представлена в листке-вкладыше для конкретного анализа.
- Программное обеспечение для анализа не выравнивает содержание вставок-делеций (вставок, делеций или их комбинаций) длиной более 25 п. о. Следовательно, программное обеспечение для анализа не обнаруживает вставки-делеции длиной более 25 п. о.
- Система валидирована в отношении обнаружения однонуклеотидных вариаций (SNV, single nucleotide variant), делеций длиной до 25 п. о. и вставок длиной до 24 п. о. при использовании с модульным программным обеспечением Germline Variant Module и Somatic Variant Module. При распознавании соматических вариаций с частотой вариаций 0,05 обнаруживались делеции длиной 25 п. о. и вставки 18 п. о.
- Программное обеспечение для анализа может не выравнивать прочтения ампликонов с очень высоким содержанием вариации, вследствие чего участок будет зарегистрирован как дикий тип. Очень высокое содержание предполагает указанные ниже случаи.
  - Прочтения, содержащие более трех вставок-делеций.
  - Прочтения длиной не менее 30 п. о. с содержанием SNV более 4 % от общей целевой длины ампликона (за исключением участков зонда).
  - Прочтения длиной менее 30 п. о. с содержанием SNV более 10 % от общей длины ампликона (включая участки зонда).
- Большие вариации, включая мультинуклеотидные вариации (MNV, multinucleotide variant) и большие вставки-делеции, могут быть указаны в файле выходных данных в формате VCF как отдельные вариации меньшего размера.
- Вариации делеции могут быть отфильтрованы или пропущены при охвате двух ампликонов в области сканирования, если длина делеции не меньше длины наложения между двумя ампликонами области сканирования.

- Система не может определять вставки-делеции, если они непосредственно прилегают к праймеру и налагающийся ампликон отсутствует. В случае участков с налагающимися ампликонами в ходе анализа невозможно обнаружить делеции, если участок наложения меньше размера делеции, которую необходимо обнаружить. Например, если участком наложения между двумя прилегающими ампликонами являются 2 (два) основания, анализ не позволяет обнаружить делеции, включающие оба эти основания. Одноосновная делеция одного из этих двух оснований может быть обнаружена.
- Как и при любом рабочем процессе подготовки библиотек на основе гибридизации, лежащие в основе полиморфизмы, мутации, вставки или делеции в олигонуклеотидно-связанных участках могут влиять на аллели, подлежащие зондированию. Следовательно, также затрагиваются распознавания, выполняемые во время секвенирования. Например:
  - вариация в фазе с вариацией в участке праймера может не быть амплифицирована, что приводит к получению ложноотрицательного результата;
  - вариации на участке праймера могут предотвращать амплификацию эталонного аллеля, что приводит к некорректному распознаванию гомозиготной вариации;
  - вариации вставки-делеции на участке праймера могут приводить к ложноположительному распознаванию в конце прочтения, прилегающего к праймеру.
- Вставки-делеции можно фильтровать в связи с ошибкой нити, если они наблюдаются в конце одного прочтения и отсекаются мягко во время выравнивания.
- Малые MNV не были валидированы.
- Вариации количества копий или структурные вариации, например слияния или транслокации, не были валидированы.
- Ниже указаны ограничения, связанные с вариациями зародышевой линии.
  - Система MiSeqDx с модулем Germline Variant Module предназначена для получения качественных результатов распознавания вариаций зародышевой линии (например, гомозиготных, гетерозиготных, дикого типа).
  - При использовании модуля Germline Variant Module минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания вариаций, составляет 150x. Число образцов и общее число целевых оснований влияют на покрытие. На покрытие могут влиять GC-состав и другой геномный состав.
  - Вариация числа копий может влиять на определение варианта как гомозиготного или гетерозиготного.
  - Вариации в определенном повторном контексте отфильтровываются в файлах VCF. Фильтр повторностей RMxN используется для фильтрации вариаций, если вся или часть последовательности вариации наблюдается повторно в референсном геноме, прилегающем к позиции вариации. Для распознавания вариаций зародышевой линии требуется не менее девяти повторов в референсном геноме, чтобы вариация была отфильтрована, при этом учитываются только повторы длиной до 5 п. о. (R5x9).

- Ниже приводятся ограничения, связанные с соматическими вариациями.
  - Система MiSeqDx с модулем Somatic Variant Module предназначена для получения качественных результатов распознавания соматических вариаций (например, наличия соматической вариации с частотой вариации, равной или превышающей 0,026 при пределе обнаружения 0,05).
  - При использовании модуля Somatic Variant Module минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания вариантов, составляет 450x на пул олигонуклеотидов. Число образцов и общее число целевых оснований влияют на покрытие. На покрытие могут влиять GC-состав и другой геномный состав.
  - Вариации в определенном повторном контексте отфильтровываются в файлах VCF. Фильтр повторов RMxN используется для фильтрации вариаций, если вся или часть последовательности вариации наблюдается повторно в референсном геноме, прилегающем к позиции варианта. Для распознавания соматических вариаций требуется не менее шести повторов в референсном геноме, чтобы вариация была отфильтрована, при этом учитываются только повторы длиной до 3 п. о. (R3x6).
  - Модуль Somatic Variant Module не позволяет отличить вариации зародышевой линии и соматические вариации. Этот модуль предназначен для обнаружения вариаций в диапазоне частот вариаций, но частота вариаций не может быть использована для разделения соматических вариаций и вариаций зародышевой линии.
  - Ткань без патологий в образце влияет на обнаружение вариаций. Регистрируемый предел обнаружения основан на частоте вариации относительно общей ДНК, выделенной как из опухоли, так и из нормальной ткани.

## Компоненты изделия

В состав системы Illumina MiSeqDx входят следующие компоненты.

Прибор MiSeqDx Instrument (номер по каталогу DX-410-1001)

Для работы прибора MiSeqDx и анализа данных требуются следующие компоненты программного обеспечения.

Программное приложение	Функция	Описание
Программное обеспечение прибора MiSeq Operating Software (MOS)	Контроль управления прибором	Программное приложение MOS позволяет управлять прибором во время секвенирования и генерировать изображения для использования программным обеспечением Real-Time Analysis (RTA). Дополнительная информация представлена в документе <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Справочное руководство по прибору MiSeqDx Instrument для MOS v4)</i> (документ № 200010452).
Real-Time Analysis (RTA)	Выполнение первичного анализа	Программное приложение RTA позволяет конвертировать изображения, сгенерированные MOS для каждой области сканирования в цикле запуска секвенирования, в файлы распознанных оснований, которые содержат входные данные аналитических модулей Local Run Manager. Программное приложение RTA не имеет пользовательского интерфейса.
Local Run Manager	Интерфейс для выбора модуля	Local Run Manager является встроенным программным обеспечением для управления пользователями, выполнения вторичного анализа и мониторинга статуса. Дополнительная информация представлена в документе <i>Local Run Manager v3 Software Reference Guide for MiSeqDx (Справочное руководство по программному обеспечению Local Run Manager v3 для MiSeqDx)</i> (документ № 200003931).

## Хранение и обращение

Параметр	Спецификация
Температура	Транспортировка и хранение: от -10 до 40 °C (от 14 до 104 °F) Условия эксплуатации: от 19 до 25 °C (от 66 до 77 °F)
Влажность	Транспортировка и хранение: влажность без конденсации Условия эксплуатации: относительная влажность 30–75 % (без конденсации)

# Необходимое оборудование и материалы (в комплект не входят)

## Расходные материалы для секвенирования

Набор реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 (номер по каталогу 20037124)

Набор реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (номер по каталогу 20063860)

## Расходные материалы, приобретаемые пользователем

Перед началом запуска убедитесь в наличии следующих расходных материалов, приобретаемых пользователем.

Расходный материал	Назначение
Спиртовые салфетки, 70%-ный изопропиловый спирт или 70%-ный этиловый спирт	Очистка стекла и площадки проточной ячейки
Низковорсные лабораторные салфетки	Очистка столика проточной ячейки
Бумага для оптических стекол, 4 × 6 дюймов (10,16 × 15,24 см)	Очистка проточной ячейки
Твин 20	Промывка прибора
Пинцет с пластмассовыми квадратными кончиками (необязательно)	Извлечение проточной ячейки из транспортировочного контейнера
Вода, ультрачистая	Промывка прибора

## Указания в отношении ультрачистой воды

При работе с прибором используйте только ультрачистую или деионизированную воду. Запрещается использовать водопроводную воду.

Используйте воду только следующих классов или эквиваленты:

- деионизированная вода;
- очищенная вода Illumina PW1;
- вода 18 мегаом (MΩ);
- вода Milli-Q;
- вода Super-Q;
- вода для молекулярно-биологических исследований.

# Предупреждения и меры предосторожности



## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

**Этот набор реагентов содержит потенциально опасные химические вещества. При их вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Используйте соответствующие риску средства индивидуальной защиты, в том числе защитные очки, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами следует обращаться как с химическими отходами и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, государственными и местными законами и нормативными актами. Информация о защите окружающей среды, охране здоровья и технике безопасности представлена в паспорте безопасности (SDS, Safety Data Sheet) по адресу [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

- Обращайтесь со всеми образцами крови, как если бы было известно, что они заражены вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита В (HBV) или другими переносимыми кровью патогенами (универсальные предостережения).
- Несоблюдение описанных процедур может привести к получению ошибочных результатов или значительному снижению качества образцов.

- Соблюдайте обычные меры предосторожности при работе в лаборатории. Запрещается пипетировать ртом. Запрещается употреблять продукты питания и напитки или курить в обозначенных рабочих зонах. При работе с образцами и реагентами набора следует надевать одноразовые перчатки и лабораторный халат. После работы с образцами и реагентами для набора следует тщательно вымыть руки.
- Для предотвращения загрязнения реагентов, инструментов и образцов геномной ДНК продуктами полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо соблюдать надлежащие стандарты лабораторной практики и гигиены в лаборатории. Загрязнение продуктами ПЦР может привести к получению неточных и недостоверных результатов.
- Для предотвращения загрязнения в зонах преамплификации и постаплификации следует использовать отдельное оборудование и расходные материалы (например, пипетки, наконечники пипеток, нагревательные блоки, вихревые мешалки и центрифуги).
- При необходимости взаимное соответствие индекса и образца должно точно отвечать распечатанной схеме плашки. Программное обеспечение Local Run Manager автоматически распространяет праймеры индекса, связанные с названиями образцов при их введении в модуль. Перед началом запуска секвенирования пользователю рекомендуется верифицировать праймеры индекса, связанные с образцами. Несовпадения между образцом и схемой плашки приводят к невозможности положительной идентификации образца и некорректному отображению результатов.
- Для защиты компьютера от вирусов настоятельно рекомендуется установить антивирусное программное обеспечение, предоставляемое пользователем. За инструкциями по установке обращайтесь к руководству пользователя.
- Эксплуатация прибора MiSeqDx с извлеченными панелями недопустима. Использование прибора с извлеченными панелями создает риск перепадов напряжения в сети и напряжения постоянного тока.
- Запрещено касаться площадки проточной ячейки в отсеке проточной ячейки. Нагреватель в данном отсеке работает при температуре 22–95 °C и может стать причиной ожогов.
- Прибор весит примерно 126 фунтов (57 кг), его падение или неправильное обращение с ним может привести к серьезной травме.
- О любых серьезных инцидентах, связанных с этим изделием, следует немедленно сообщать компании Illumina и компетентному органу государства, в котором зарегистрированы пользователь и (или) пациент.

## Инструкции по применению

Приведенные ниже инструкции по применению прибора MiSeqDx требуют использовать реагенты, поставляемые в комплекте с набором реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3.

## Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager

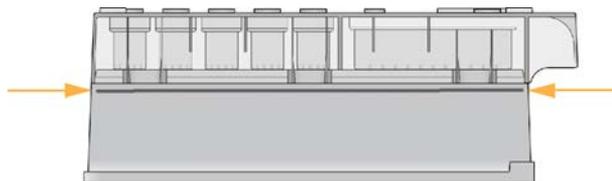
Подробные инструкции по созданию запуска представлены в документе *Local Run Manager v3 Software Reference Guide for MiSeqDx (Справочное руководство по программному обеспечению Local Run Manager v3 для прибора MiSeqDx)* (документ № 200003931) и руководстве по модулю Local Run Manager, применимому к используемому вами аналитическому модулю.

## Подготовка картриджа с реагентами

В приведенных ниже инструкциях описано, как размораживать реагенты на водяной бане комнатной температуры.

1. Извлеките картридж с реагентами из морозильной камеры с температурой от  $-25$  до  $-15$  °C.
2. Поместите картридж с реагентами в водяную баню, содержащую деионизированную воду комнатной температуры в количестве, достаточном для погружения основания картриджа с реагентами до указанной на нем линии. Не погружайте картридж глубже, чем до линии максимального уровня воды.

рисунок 1 Линия максимального уровня воды



3. Оставьте картридж с реагентами размораживаться в водяной бане комнатной температуры приблизительно на 60–90 минут или до полного размораживания.
4. Извлеките картридж из водяной бани и осторожно постучите им по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа. Вытрите основание картриджа насухо. Убедитесь, что вода не попала на верхнюю часть картриджа с реагентами.

## Проверка картриджа с реагентами

1. Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы перемешать размороженные реагенты, а затем внимательно осмотрите и проверьте, чтобы все позиции были разморожены.
2. Проверьте реагенты в положениях 1, 2 и 4 и убедитесь в том, что они равномерно перемешаны и не содержат осадка.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Чрезвычайно важно, чтобы реагенты в картридже полностью оттаяли и перемешались. Это обеспечит надлежащее секвенирование.

3. Осторожно постучите картриджем по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реагентах.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Сипперные трубки MiSeqDx опускаются до дна каждого из резервуаров и всасывают реагенты, поэтому важно, чтобы в резервуарах не было пузырьков воздуха.

4. Поместите картридж с реагентами на лед или положите в холодильник с температурой от 2 до 8 °C (не более чем на шесть часов) до тех пор, пока вы не подготовитесь к настройке запуска. Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска.

## Подготовка образцов для секвенирования

Указания по подготовке библиотек образца для секвенирования, в том числе разведения и объединения библиотек, см. в разделе «Инструкции по применению» листка-вкладыша по подготовке библиотек.

Порядок разведения библиотек образца зависит от сложности пулов олигонуклеотидов. На приборе MiSeqDx требуется оптимизация плотности кластеров, а оптимальная плотность кластеров зависит от конкретного метода подготовки библиотеки.

## Загрузка библиотек образцов в картридж

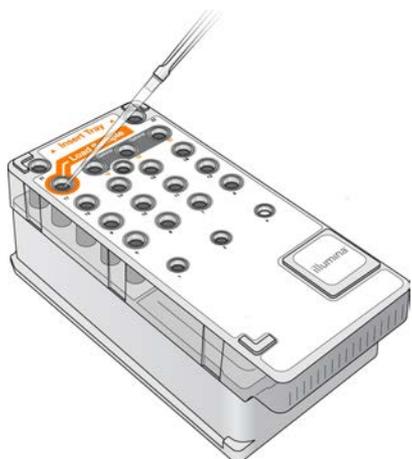
Когда картридж с реагентами полностью оттаял и готов к использованию, вы можете загружать образцы в картридж.

1. Отдельным чистым и пустым наконечником пипетки (1 мл) проколите фольгу, запечатывающую резервуар, на картридже с реагентами с этикеткой **Load Samples** (Загрузка образцов).

**ПРИМЕЧАНИЕ** Не прокалывайте другие положения для реагентов. Другие положения для реагентов прокалываются автоматически во время запуска.

2. Пипеткой внесите 600 мкл подготовленных библиотек образцов разбавленной библиотеки ампликонов (DAL, diluted amplicon library) в резервуар **Load Samples** (Загрузка образцов). Не касайтесь запечатывающей фольги.
3. После загрузки образца проверьте резервуар на наличие пузырьков воздуха. Если они присутствуют, аккуратно постучите картриджем по лабораторному столу, чтобы их выпустить.

рисунок 2 Загрузка библиотек



4. Перейдите непосредственно к настройке запуска, используя интерфейс программного обеспечения прибора MiSeq Operating Software (MOS).

## Настройка запуска

Полная инструкция по настройке запуска представлена в документе *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Справочное руководство по прибору MiSeqDx Instrument для MOS v4)* (документ № 200010452).

1. Войдите в систему MiSeqDx с помощью пароля для программного обеспечения Local Run Manager.
2. На главном экране программного обеспечения MOS выберите **Sequence** (Секвенировать).
3. Выберите запуск из списка, затем нажмите **Next** (Далее).  
В приведенном ниже порядке откроется серия экранов с настройкой запуска. Load Flow Cell (Загрузка проточной ячейки), Load Reagents (Загрузка реагентов), Review (Обзор) и Pre-Run check (Проверка перед запуском).
4. При появлении экрана Load Flow Cell (Загрузка проточной ячейки) очистите и загрузите проточную ячейку.
5. Закройте защелку проточной ячейки и дверцу отсека для проточной ячейки.  
И защелка, и дверца отсека должны быть закрыты перед началом запуска. Когда загружена проточная ячейка, программное обеспечение начинает считывать и регистрировать RFID. Подтверждение того, что RFID была успешно прочитана, появится в нижнем правом углу экрана.
6. Следуя указаниям программного обеспечения, загрузите бутылку с раствором MiSeqDx SBS Solution (PR2), убедитесь, что бутылка для отходов пуста, и загрузите картридж с реагентами. Когда бутылка с раствором MiSeqDx SBS Solution (PR2) и картридж с реагентами будут загружены, программа начнет считывать и записывать RFID. Подтверждение того, что RFID была успешно прочитана, появится в нижнем правом углу экрана.

7. В начале запуска открывается экран Sequencing (Секвенирование). На экране отображается выполняемый запуск, включая значения интенсивности и показатели качества (показатели Q).

## Результаты

Встроенное программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA) выполняет анализ изображения и определение последовательности нуклеотидов, а также присваивает оценку качества каждому основанию в каждом цикле секвенирования. По завершении первичного анализа модуль на приборе MiSeqDx, выбранный в разделе [Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager на странице 10](#), автоматически начинает вторичный анализ. Другие рабочие процессы описаны в документации для конкретного анализа.

## Процедуры контроля качества

Программное обеспечение MiSeqDx оценивает каждый запуск, образец и распознанное основание в соответствии с параметрами контроля качества. При необходимости также следует проводить оценку на предмет ожидаемых результатов с использованием положительных и отрицательных контролей, включенных в подготовку библиотек.

## Эксплуатационные характеристики

Все исследования выполняли на приборе MiSeqDx.

В исследованиях зародышевой линии использовали либо реагенты MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, либо реагенты TruSeq Custom Amplicon Kit Dx для подготовки библиотеки. В этих двух наборах используются одинаковые реагенты для подготовки библиотеки, а рабочий процесс имеет лишь одно различие: число циклов полимеразной цепной реакции (ПЦР) (25 и 28 соответственно). Дополнительные циклы ПЦР позволяют вводить меньшее количество ДНК с набором TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 нг), по сравнению с MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 нг). Это доказано в исследовании вводимого количества ДНК с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Библиотеки, подготовленные с помощью MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, секвенировали с реагентами для секвенирования, входящими в набор.

Библиотеки, подготовленные с помощью набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, секвенировали с использованием набора MiSeqDx Reagent Kit v3. Эти реагенты для секвенирования увеличили выход, по сравнению с реагентами в анализе MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Исследование охватывает диапазоны производительности при анализе образцов, которые поддерживает набор MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx может пропускать 1–96 образцов/запуск, в зависимости от анализа. Набор MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro поддерживает более низкую производительность для анализа образцов в этом же диапазоне для данных анализов.

В исследованиях соматической линии использовался набор TruSeq Custom Amplicon Kit Dx с набором реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3.

Рабочие процессы для зародышевой или соматической линии, описанные для TruSeq Custom Amplicon Kit Dx по подготовке библиотек для секвенирования, выполнялись в рамках анализа с использованием модуля Germline Variant Module или Somatic Variant Module соответственно, с двумя исключениями. В исследованиях с одним геном (рабочие характеристики модуля Germline; анализ MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) или двух генов (рабочие характеристики модуля Somatic) как репрезентативных панелей мутаций использовали разработанные для конкретного анализа рабочие процессы и аналитические модули.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Представлена сводная информация по геномному составу ампликона в сравнении с секвенируемой геномной нитью. Для ампликонов, созданных по отрицательной нити, референсным геномным составом является обратный комплимент (например, области поли (A) на ампликонах отрицательной нити соответствуют областям поли (T) на референсном геноме).

## Определения расчетов, используемых для описания рабочих характеристик

- Показатель согласованности положительных результатов (PPA, Positive Percent Agreement) рассчитывается как доля локусов, классифицированных как вариации по эталонному методу, которые были корректно зарегистрированы в процессе анализа.
  - (Число локусов вариации, корректно зарегистрированных в процессе анализа) / (общее число локусов вариации)Локусы вариации, зарегистрированные в процессе анализа, согласующиеся с эталонным методом, являются истинноположительными (TP, true positive). Локусы вариации, в ходе анализа зарегистрированные в качестве эталонных распознаваний или в качестве других распознаваний вариаций, являются ложноотрицательными (FN, false negative).
- Показатель согласованности отрицательных результатов (NPA, Negative Percent Agreement) рассчитывается как доля локусов, которые классифицированы как локусы дикого типа по эталонному методу и корректно зарегистрированы в процессе анализа.

- (Число локусов дикого типа, корректно зарегистрированных в процессе анализа) / (общее число локусов дикого типа)  
Локусы дикого типа, зарегистрированные в процессе анализа, которые согласуются с эталонным методом, являются истинноотрицательными (TN, true negative). Локусы дикого типа, зарегистрированные в процессе анализа как вариации, являются ложноположительными (FP, false positive).
- Показатель общей согласованности (OPA, Overall Percent Agreement) рассчитывается как доля локусов, корректно зарегистрированных в ходе анализа, относительно результатов, полученных эталонным методом.
  - $$\frac{((\text{Число локусов вариации, корректно зарегистрированных в ходе анализа}) + (\text{число локусов дикого типа, корректно зарегистрированных в ходе анализа}))}{((\text{общее число локусов вариации}) + (\text{общее число локусов дикого типа}))}$$
- Для приложений определения вариаций при вычислении значений PPA, NPA и OPA не учитываются нераспознавания (локусы вариации или эталона, не соответствующие одному или нескольким фильтрам качества). В двух исследованиях включены нераспознавания в их показателях «% корректных распознаваний», и такое включение нераспознаваний отмечено для применимых таблиц.
- Частота распознавания рассчитывается как общее число локусов, проходящих через фильтр, разделенное на общее число позиций, секвенированных для хромосом 1–22. Хромосомы X и Y исключены. Данный параметр не учитывает согласованность распознаваний с эталонным методом.

Рабочие характеристики, относящиеся к преаналитическим факторам (например, методы извлечения или входящее значение ДНК), см. в листке-вкладыше для соответствующего метода подготовки библиотеки.

## Индексирование образца

Праймеры индексов образцов, добавленные во время подготовки библиотеки, присваивают уникальную последовательность каждому образцу ДНК, позволяя объединять несколько образцов в единый запуск секвенирования. Индексирование образца было протестировано для рабочих процессов, используемых для зародышевой линии и соматической линии.

В общей сложности протестированы 96 индексов образцов в ходе репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований на нить во всех 23 хромосомах человека, с целью проверки способности анализа систематически выполнять распознавание генотипа для определенного образца в различных сочетаниях праймеров индексов. Y-хромосома не содержит доверительных областей, и ее оценку не проводили. Восемь уникальных образцов протестировали с использованием 12 различных сочетаний праймеров индексов на образец. Результаты анализа образца, полученные на модуле Germline Analysis Module, сравнивали с Platinum Genomes версии 2016-01. PPA (SNV и вставки-делеции) превышала 97 % (истинноположительные распознавания составили не менее 70 для SNV, 38 для вставок,

36 для делеций), а NPA составила 100 % (минимум 23 440 референсных позиций на сочетание индексов) для каждого из сочетаний 96 индексов. Отдельно был протестирован одиночный индекс, чтобы подтвердить, что химическая реакция секвенирования с набором реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 может поддерживать менее восьми образцов (предыдущая химическая реакция в наборе MiSeqDx Universal Kit 1.0 ограничивалась минимум восемью образцами). Одиночный индекс имел значения PPA 98,9 % (180/182) для SNV, 100 % (38/38) для вставок и 100 % (46/46) для делеций. NPA составляла 100 % (23 856 / 23 856).

Были протестированы 12 реплик (24 библиотеки) образца, чтобы измерить точность индекса с соматическими вариациями при частоте 0,05–0,10 с использованием модуля Somatic Variant Module (для соматических распознаваний используются две комбинации индексов на реплику). PPA составляла 100 % для SNV (64/64), вставок (11/11) и делеций (19/19). NPA составила 100 % (минимум 11 590 референсных позиций на комбинацию индексов) для всех комбинаций индексов.

## Перенос образцов

Рабочий процесс прибора MiSeqDx подразумевает подготовку библиотеки и секвенирование нескольких образцов с контролями, обрабатываемыми одновременно. Исследование по переносу образцов проводилось с целью оценки, влияют ли на результаты теста ложноположительные результаты, получаемые из-за переноса с загрязнением от лунки к лунке во время подготовки библиотеки, а также от запуска к запуску между последовательными запусками секвенирования. Использовали соматические вариации, поскольку их можно обнаружить при более низкой частоте аллелей, чем вариации зародышевой линии.

Среди образцов были четыре образца геномной ДНК из клеточных линий, каждый из которых содержал различные мутации панелей в репрезентативном анализе на два гена. Образцы были такими, чтобы мутация в одной позиции имела эталонную последовательность (дикого типа) в других.

Перенос из лунки в лунку определяется как режим отказа, возможно, возникший вследствие этапов ручной обработки (пипетирование, смешивание образцов и т. д.). Для оценки переноса из одной лунки с образцом в другую выполняли два тестовых запуска:

- расположение образца геномной ДНК (гДНК) с высокими входными значениями, содержащего мутацию в гене 1, в шахматном порядке с образцом гДНК с низкими входными значениями, содержащим мутацию в гене 2;
- расположение образца гДНК с высокими входными значениями, содержащего мутацию в гене 2, в шахматном порядке с образцом гДНК с низкими входными значениями, содержащим мутацию в гене 1.

В каждом запуске оценивали всего 12 реплик на ложноположительные результаты (например, мутация в гене 1, зафиксированная в лунке, обозначенная как образец с мутацией в гене 2 или наоборот).

Перенос от запуска к запуску определяется как режим отказа, потенциально созданный остатком от предыдущего запуска секвенирования. Чтобы определить, был ли перенос между запусками секвенирования, подготовили две плашки, в каждой по 11 реплик одинарного уникального образца гДНК с высокими входными значениями плюс холостой образец. Их секвенировали последовательно на одном приборе MiSeqDx и оценивали на ложноположительные результаты. Первый запуск содержал 11 реплик образца с мутацией в гене 2 плюс одна холостая проба. Второй запуск содержал 11 реплик образца с мутацией в гене 1 плюс одна холостая проба. Сначала секвенировали библиотеку образца с мутацией в гене 2, далее выполняли запуск секвенирования с библиотекой образца с мутацией в гене 1, а затем еще один повторный запуск секвенирования библиотеки образца с мутацией в гене 2. Если наблюдались какие-либо мутации в гене 2 в запуске, где была только мутация в гене 1, и наоборот, это указывало на перенос.

Ложноположительных результатов из-за переноса *от лунки к лунке* зафиксировано не было (0/24, 0 %). Все ожидаемые мутации были обнаружены. Ложноположительных результатов из-за переноса *от запуска к запуску* зафиксировано не было (0/24, 0 %). Все ожидаемые мутации были обнаружены. Ложноположительных результатов из-за *общего* переноса (от лунки к лунке и от запуска к запуску вместе) зафиксировано не было (0/48, 0 %).

## Рабочие характеристики модуля Germline

В описанных здесь исследованиях для анализа данных секвенирования использовали модуль Germline Variant Module, за исключением тех исследований, в которых применяется панель с одним геном. В них применяли специальный модуль для конкретного анализа.

### Точность

Описанное ниже исследование было проведено для оценки точности прибора MiSeqDx при использовании с набором реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 и ДНК высокого качества. Это исследование было выполнено путем репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах с использованием 150 ампликонов. Y-хромосома не содержит доверительных областей, и ее оценку не проводили. Двенадцать уникальных образцов, использованных в этом исследовании, взяты из одной семьи (двое родителей и десять детей) и часто секвенируются в различных лабораториях по различным методологиям секвенирования. Пять образцов — от женщин, и семь — от мужчин. Все образцы проходили тестирование в двух повторениях. Точность определяли для SNV, вставок и делеций посредством сравнения данных исследования с подробно описанной референсной базой данных. Последовательность из референсной базы данных (Platinum Genomes, версия 2016-01) получали посредством комбинации нескольких методологий секвенирования, публично доступных данных и наследственной информации. Доверительные геномные области были определены на основе данного эталонного метода, если не указано иное. Всего запуск образцов проводили восемь раз. Приведенные таблицы с данными о точности сформированы на основании данных из первого запуска.

В [таблице 1](#) приведены данные исследования, представленные с положительной и отрицательной согласованностью для отдельного образца, где результаты вариации сравниваются с подробно описанным эталонным методом анализа состава для расчетов PPA. Представлена совокупность трех типов вариаций (SNV, вставки и делеции). Поскольку эталонный метод позволяет получить результаты только для единичных нуклеотидных вариаций и вставок/делеций, результаты распознавания невариантных оснований сравнивают с результатами секвенирования референсного генома человека в сборке hg19 для расчета NPA.

таблица 1 Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument по каждому образцу

Образец	Средняя частота распознавания	Общее число вариаций	Общее число TP вариаций	Общее число FN вариаций	Общее число нераспознаваний	Общее число TN распознаваний	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24 024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23 856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24 054	99,5	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

Репрезентативный анализ состоял из 150 ампликонов, созданных для различного геномного состава. Диапазон GC-состава ампликонов: 26–87 %. Для ампликонов также имеется диапазон единичных нуклеотидных (например, поли (A), поли (T)), динуклеотидных и тринуклеотидных повторов. Данные были компилированы по ампликонам (таблица 2) на процентную долю корректных распознаваний. Процентная доля корректных распознаваний состоит из распознаваний вариации и эталонных распознаваний и составляет менее 100 %, если имеются некорректные распознавания или нераспознавания. Нераспознавания возникают вследствие несоблюдения требований для одного или нескольких фильтров при распознавании вариации (например, недостаточное покрытие).

Из восьми FN вариаций из [таблицы 2](#) семь возникло со вставкой 1 п. о. на ампликоне 111, который также содержит гомополимер поли (A) и GC-состав 0,29. Остальной 1 FN (неверное распознавание) возник из-за неожиданной гетерозиготной SNV на ампликоне 125 с GC-составом 0,68, распознанным как гомозиготная вариация. Частота вариации SNV была 0,71, что больше порога 0,70, позволяющего отнести ее к гомозиготной вариации. Ампликоном с самым низким процентом верных распознаваний (98,2 %) был ампликон 17 с 40 нераспознаваниями, содержащий повторы AT и GC-состав 27 %.

таблица 2 Точность на уровне ампликонов для прибора MiSeqDx Instrument

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Вставка-делеция	0,22	2232	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли (A) (5), поли (C) (5), вставка-делеция	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Вставка-делеция	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Вставка-делеция	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли (G) (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли (T) (10), вставка-делеция	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли (A) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Вставка-делеция	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Вставка-делеция	0,38	1920	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/П	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли (А) (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли (Т) (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли (Т) (5), поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/П	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), вставка-делеция	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/П	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), вставка-делеция	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5), поли (А) (9), ТG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Вставка-делеция	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли (А) (6)	0,26	1872	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли (G) (6), поли (T) (5), поли (A) (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/П	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли (A) (5), вставка- делеция	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли (A) (5)	0,46	1656	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли (A) (7), вставка- делеция	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/П	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/П	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли (A) (6), вставка- делеция	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли (T) (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Вставка- делеция	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	Поли (G) (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Вставка- делеция	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), вставка- делеция	0,61	2244	0	12	99,5

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли (Т) (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Вставка-делеция	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли (С) (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли (А) (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/П	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Вставка-делеция	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли (А) (7), АG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Вставка-делеция	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли (G) (6), поли (С) (6), вставка-делеция	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/П	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Вставка-делеция	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/П	0,42	1992	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли (G) (7), СТС(4), вставка-делеция	0,61	2113	0	23	98,9
53	8	76518625	76518691	67	67	Вставка-делеция	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли (G) (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Вставка-делеция	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/П	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли (С) (6), вставка-делеция	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли (G) (5), вставка-делеция	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	Поли (Т) (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли (А) (5), поли (Т) (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Вставка-делеция	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), вставка-делеция	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/П	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/П	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/П	0,45	2304	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
68	11	30177648	30177717	70	70	Вставка-делеция	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/П	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Вставка-делеция	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/П	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли (А) (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/П	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли (G) (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Вставка-делеция	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли (А) (5), СА(3), вставка-делеция	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	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли (А) (7), АС(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/П	0,49	1944	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли (А) (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли (G) (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/П	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли (А) (5), поли (Т) (7), поли (А) (7), вставка-делеция	0,22	2112	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
85	13	44880112	44880200	89	89	Вставка-делеция	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Вставка-делеция	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/П	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Вставка-делеция	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Вставка-делеция	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли (А) (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Вставка-делеция	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли (С) (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Вставка-делеция	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли (Т) (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Вставка-делеция	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/П	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Вставка-делеция	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/П	0,27	1512	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли (C) (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли (C) (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли (T) (5), вставка-делеция	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	Поли (C) (5), вставка-делеция	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Вставка-делеция	0,46	2184	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Вставка-делеция	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли (T) (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли (A) (13), вставка-делеция (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли (A) (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли (A) (7), AT(3), AT(4), AT(4), вставка-делеция	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Вставка-делеция	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли (T) (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/П	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), вставка-делеция	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), вставка-делеция	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/П	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/П	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/П	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/П	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/П	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), вставка-делеция	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Вставка-делеция	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Вставка-делеция	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли (G) (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Вставка-делеция	0,57	2088	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
135	21	30300823	30300888	66	66	Вставка-делеция	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли (Т) (6), СА(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), вставка-делеция	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли (А) (6), AG(3), вставка-делеция	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли (Т) (5), поли (А) (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Вставка-делеция	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/П	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Вставка-делеция	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/П	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Вставка-делеция	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли (Т) (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли (С) (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/П	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	Н/П
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	Н/П
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли (А) (5)	0,37	0	0	0	Н/П

Вариации, которые не были распознаны, представлены в [таблице 3](#). В таблице представлены конкретные фильтры, из-за которых возникли нераспознавания. Вставка на ампликоне 111 была отфильтрована в девяти из 16 случаев, при этом остальные семь случаев были распознаны как эталон и, следовательно, считаются FN.

таблица 3 Сводная таблица по нераспознаваниям вариаций

Номер ампликона	Хромосома: позиция	Вариация	Состав соответствующего ампликона	Фильтр	Пропущенные вариации	Ожидаемое число вариаций	FN распознавания
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	Поли (A) (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Фильтр повторов. Вариация фильтруется, если вся или часть вариации наблюдается повторно в референсном геноме, прилегающем к позиции вариации. Требуется не менее девяти повторов в референсном геноме, при этом учитываются только повторы длиной до 5 п. о.

Результаты секвенирования образца NA12878 сравнили с параметрами генотипа NA12878 с высокой степенью достоверности, установленными Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Из 150 ампликонов 92 полностью содержались внутри геномных участков с высокой степенью достоверности, 41 ампликон имел частичное наложение, и 17 ампликонов не имели наложения в последовательности NIST. В результате получено 10 000 координат на одну повторность для сравнения. Невариантные распознавания оснований сравнили с последовательностью референсного генома человека в сборке 19. Результаты анализа точности приведены в [таблице 4](#).

таблица 4 Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument для образца NA12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средняя частота распознавания	Общее число TP вариаций	Общее число FN вариаций	Общее число TN распознаваний	Общее число FP распознаваний	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19 380	0	100	100	100

Затем образцы были проанализированы для распознавания малых вставок и делеций (вставок-делеций) ([таблица 5](#)). В некоторых случаях вставка-делеция была общей для двух или более образцов, как показано в столбце «Общее число реплик образца со вставкой-делецией». Результаты для обеих реплик 12 действительных образцов представлены в [таблице 5](#). Была обнаружена 71 вставка-делеция размером от 1 до 24 п. о. (вставки) и от 1 до 25 п. о. (делеции). Каждая из 69 вставок-делеций была обнаружена с показателем согласованности положительных результатов 100 %. Одна делеция (ампликон 64, делеция 2 п. о. (chr10 55892600 TAC>T)) не имела верных распознаваний, поскольку каждая из этих вариаций была нераспознанной из-за

фильтра R5x9. Поэтому PPA, которая исключает нераспознавания, не могла быть рассчитана. Еще одна вставка-делеция, вставка 1 п. о. (chr17 39589692 C>CA на ампликоне 111), также не имела верных распознаваний, поскольку девять вариаций были нераспознанными из-за фильтра R5x9, а семь были распознаны как FN.

таблица 5 Сводная информация об обнаружении вставок-делеций прибором MiSeqDx Instrument

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
1	1	36450544	93	Делеция 25 п. о.	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Делеция 3 п. о.	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Вставка 23 п. о.	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Делеция 17 п. о.	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Вставка 5 п. о.	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Вставка 3 п. о.	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Вставка 7 п. о.	T>TTTGATA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	Делеция 6 п. о.	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Вставка 5 п. о.	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Вставка 12 п. о.	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Вставка 2 п. о.	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Делеция 23 п. о.	ТААСТТААААТТАСААААТААССС>Т	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Вставка 9 п. о.	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
21	3	190106071	75	Делеция 1 п. о.	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Делеция 8 п. о.	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Вставка 11 п. о.	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Делеция 4 п. о.	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Вставка 8 п. о.	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Делеция 21 п. о.	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Делеция 3 п. о.	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Делеция 25 п. о.	CTTTCACTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Делеция 23 п. о.	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Вставка 1 п. о.	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Делеция 4 п. о.	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Вставка 1 п. о.	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Делеция 4 п. о.	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Делеция 11 п. о.	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Делеция 1 п. о.	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Вставка 4 п. о.	T>TACTG	14	0	0	14	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
55	9	105586193	65	Вставка 4 п. о.	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Делеция 21 п. о.	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Делеция 3 п. о.	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Делеция 16 п. о.	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Делеция 2 п. о.	TAC>T	10	10	0	0	Н/П
68	11	30177690	70	Вставка 2 п. о.	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Вставка 8 п. о.	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Делеция 8 п. о.	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Делеция 2 п. о.	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Вставка 21 п. о.	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Вставка 19 п. о.	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Вставка 4 п. о.	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Делеция 20 п. о.	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Делеция 22 п. о.	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Вставка 4 п. о.	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Делеция 16 п. о.	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
93	14	102808554	94	Делеция 5 п. о.	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Делеция 6 п. о.	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Делеция 25 п. о.	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Вставка 3 п. о.	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Вставка 4 п. о.	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Делеция 7 п. о.	ATTATTTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Делеция 1 п. о.	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Вставка 18 п. о.	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Вставка 4 п. о.	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Вставка 1 п. о.	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Вставка 24 п. о.	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Делеция 4 п. о.	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Делеция 12 п. о.	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Вставка 22 п. о.	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Вставка 3 п. о.	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	Делеция 2 п. о.	ACT>A	20	0	0	20	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
130	20	21766863	70	Делеция 15 п. о.	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Вставка 5 п. о.	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Вставка 11 п. о.	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Делеция 16 п. о.	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Вставка 11 п. о.	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Делеция 21 п. о.	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Делеция 5 п. о.	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Вставка 6 п. о.	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Вставка 5 п. о.	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Делеция 10 п. о.	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Воспроизводимость

Чтобы оценить воспроизводимость результатов, полученных на приборе MiSeqDx, было проведено два исследования с клеточными линиями (исследование 1 и 2) или обедненной лейкоцитами кровью, с добавлением клеточных линий (исследование 2). В исследовании 1 использовалось несколько приборов. В исследовании 2 участвовало несколько центров.

## Исследование 1

Воспроизводимость результатов, полученных на приборе MiSeqDx, определяли на двух приборах при работе двух операторов и использовании двух партий реагентов во время в общей сложности восьми запусков. Репрезентативный анализ, образцы и эталонный метод являются такими же, как и описанные для исследования точности.

Результаты представлены по каждому ампликону для каждого прибора (таблица 6) и демонстрируют воспроизводимость распознавания на разных приборах. Процентная доля корректных распознаваний включала как некорректные распознавания, так и нераспознавания (вследствие несоблюдения требований для одного или нескольких фильтров при распознавании вариации). Приборы давали сопоставимое число нераспознаваний и некорректных распознаваний, в зависимости от конкретного ампликона.

таблица 6 Результаты по воспроизводимости от одного тестируемого прибора к другому для прибора MiSeqDx Instrument (уровень ампликонов)

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Вставка-делеция	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли (A) (5), поли (C) (5), вставка-делеция	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Вставка-делеция	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Вставка-делеция	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли (G) (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли (T) (10), вставка-делеция	0,39	6720	0	0	6720	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли (A) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Вставка-делеция	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Вставка-делеция	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/П	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли (A) (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли (T) (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли (T) (5), вставка-делеция	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли (T) (5), поли (A) (6), вставка-делеция	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/П	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли (T) (5), вставка-делеция	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), вставка-делеция	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/П	0,43	7968	0	0	7968	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), вставка-делеция	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5) Поли (А) (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Вставка-делеция	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли (А) (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли (G) (6), поли (Т) (5) Поли (А) (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/П	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли (А) (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли (А) (7), вставка-делеция	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/П	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), ССА(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/П	0,39	6144	0	0	6144	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли (Т) (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), АG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Вставка-делеция	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли (G) (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Вставка-делеция	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	ГСТ(5), вставка-делеция	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли (Т) (5), ТСТ (3), СТТ (3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Вставка-делеция	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли (С) (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли (А) (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/П	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Вставка-делеция	0,35	8448	0	0	8448	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли (A) (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Вставка-делеция	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли (G) (6), поли (C) (6), вставка-делеция	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/П	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Вставка-делеция	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/П	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли (G) (7), CTC (4), вставка-делеция	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Вставка-делеция	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли (G) (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Вставка-делеция	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/П	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	Поли (C) (6), вставка-делеция	0,68	9312	0	0	9312	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли (G) (5), вставка-делеция	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	Поли (T) (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли (A) (5), поли (T) (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Вставка-делеция	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), вставка-делеция	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/П	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/П	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/П	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Вставка-делеция	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/П	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Вставка-делеция	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/П	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли (A) (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/П	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли (G) (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Вставка-делеция	0,53	8160	0	0	8160	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли (A) (5), CA(3), вставка-делеция	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	Поли (C) (5), вставка-делеция	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли (A) (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/П	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли (A) (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли (G) (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/П	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли (A) (5), поли (T) (7), поли A) (7), вставка-делеция	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Вставка-делеция	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Вставка-делеция	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/П	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли (T) (5), вставка-делеция	0,19	6830	0	82	6835	0	77

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
90	14	58050030	58050110	81	81	Вставка-делеция	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Вставка-делеция	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли (А) (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Вставка-делеция	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли (С) (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Вставка-делеция	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли (Т) (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Вставка-делеция	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/П	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Вставка-делеция	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/П	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли (С) (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли (С) (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,37	8736	0	0	8736	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли (С) (5), вставка- делеция	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Вставка- делеция	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Вставка- делеция	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли (Т) (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли (А) (13), вставка- делеция (×2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли (А) (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли (А) (7), АТ(3), АТ(4), АТ (4), вставка- делеция	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Вставка- делеция	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли (Т) (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/П	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли (А) (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли (А) (5), вставка- делеция	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), вставка- делеция	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), вставка- делеция	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/П	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Н/П	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/П	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/П	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Н/П	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG (4), вставка- делеция	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Вставка- делеция	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Вставка- делеция	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли (G) (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Вставка- делеция	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Вставка- делеция	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли (Т) (6), СА(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), вставка-делеция	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли (A) (6), AG(3), вставка-делеция	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли (T) (5), поли (A) (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Вставка-делеция	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/П	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Вставка-делеция	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/П	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Вставка-делеция	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли (T) (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли (C) (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/П	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли (A) (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Результаты исследования воспроизводимости были проанализированы для каждого оператора с использованием частоты вариаций (таблица 7). Этот анализ показал, что частоты вариаций были единообразны у разных операторов. Представлены средние значения по частотам вариаций  $\pm 1$  стандартное отклонение.

таблица 7 Результаты от оператора к оператору для прибора MiSeqDx Instrument

Диапазон частот вариаций	Число уникальных вариаций	Общее число проанализированных вариаций, оператор 1	Общее число проанализированных вариаций, оператор 2	Среднее заявленное значение частоты вариаций (CO), оператор 1	Среднее заявленное значение частоты вариаций (CO), оператор 2
Гомозиготные (0,70–1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Гетерозиготные (0,20–0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Результаты исследования воспроизводимости по каждому образцу представлены в совокупности со всех восьми запусков (таблица 8). Обнаружение оценивают для каждого типа варианта — SNV, вставок и делеций — отдельно. Эталонные позиции исключены. Этот анализ показал, что результаты для вариаций были воспроизводимыми по всем образцам.

таблица 8 Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument по каждому образцу

Образец	SNV				Вставки				Делеции			
	Всего	Всего TP	Всего F	Всего F	Всего F	Всего TP	Всего FP	Всего FN	Всего	Всего TP	Всего FP	Всего 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	0	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	0
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

Данные, полученные по восьми запускам в этом исследовании воспроизводимости, подтверждают заявление о том, что при секвенировании на приборе MiSeqDx можно получать согласующиеся результаты:

- GC-состав  $\geq 19\%$  (все распознанные основания в 192 из 192 секвенированных ампликонов с GC-составом в объеме 19%, распознанных корректно с частотой нераспознавания 1,1%);
- GC-состав  $\leq 78\%$  (все распознанные основания в 192 из 192 секвенированных ампликонов с GC-составом в объеме 78%, распознанных корректно без нераспознаваний);
- значения длин хвостов поли (A)  $\leq 8$  (повтор поли (A) восьми нуклеотидов был распознан корректно в 192 из 192 секвенированных ампликонов, содержащих поли (A) = 8);
- значения длин хвостов поли (T)  $\leq 10$  (повтор поли (T) десяти нуклеотидов был распознан корректно в 192 из 192 секвенированных ампликонов, содержащих поли (T) = 10);
- значения длин хвостов поли (G)  $\leq 7$  (повтор поли (G) семи нуклеотидов был распознан корректно в 192 из 192 секвенированных ампликонов, содержащих поли (G) = 7);
- значения длин хвостов поли (C)  $\leq 6$  (повтор поли (C) шести нуклеотидов был распознан корректно в 576 из 576 секвенированных ампликонов, содержащих поли (C) = 6);
- значения длин динуклеотидного повтора  $\leq 11x$  (все распознанные основания в 192 из 192 секвенированных ампликонов, содержащих динуклеотидные повторы размером 11x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,5%);
- значения длин тринуклеотидного повтора  $\leq 5x$  (все распознанные основания в 192 из 192 секвенированных ампликонов, содержащих тринуклеотидные повторы размером 5x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,5%);
- 24 или менее вставок оснований и 25 или менее делеций оснований:
  - вставки 24 оснований, распознанные корректно в 192 из 192 образцов;
  - делеции 25 оснований, распознанные корректно в 223 образцах и заявленные как неверно распознанные в одном образце из 224.

## Исследование 2

Исследование воспроизводимости результатов анализа от центра к центру при проведении репрезентативного анализа Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay включало анализ ряда клинически достоверных генетических вариаций гена *CFTR*, проанализированных с помощью программного обеспечения MiSeq Reporter с использованием рабочего процесса таргетного секвенирования ДНК MiSeqDx Platform. В слепом исследовании принимали участие три исследовательских центра, в каждом из

которых участвовали по два оператора. Каждый оператор в каждом центре протестировал две подробно охарактеризованные панели из 46 образцов каждая, всего 810 распознаваний на центр. Панели содержали смесь геномной ДНК из клеточных линий с известными вариациями в гене *CFTR*, а также обедненную лейкоцитами кровь, с добавлением клеточных линий с известными вариациями в гене *CFTR*. Были предоставлены образцы крови, что позволило провести этапы выделения, используемые для подготовки гДНК, которая служит первичными входными данными для рабочего процесса анализа. Показатель успешного прохождения образцов, определяемый как число образцов, соответствовавших показателям контроля качества при первой попытке, составил 99,88 %. Все результаты тестов основаны на первоначальном тестировании.

таблица 9 Сводные результаты исследования воспроизводимости, выполненного с применением репрезентативного анализа MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
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 отсутствуют	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	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

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	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	Н/П	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	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

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96

Панель	Образец №	Генотип образца	Вариации	Всего распознаваний на центр	Положительные согласующиеся распознавания (вариации)			Отрицательные согласующиеся распознавания (дикий тип)			Число неверных распознаваний	Число нераспознаваний	Согласованность положительных результатов (%)	Согласованность отрицательных результатов (%)	Общая согласованность (%)
					Центр 1	Центр 2	Центр 3	Центр 1	Центр 2	Центр 3					
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Н/П	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
Всего				74 556	2209			221 182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Положение мутации дикого типа, соответствующее вариации N1303K для одной реплики, не распознано из-за недостаточного покрытия.

<sup>2</sup> Одна реплика образцов 5 и 75 имела показатель распознаваний 0 %. Дальнейшая проверка показала, что образцы могли быть не добавлены в плашку для образца до приготовления библиотеки, поскольку объемы образцов, оставшиеся в пробирках, указывали на то, что из пробирок ничего взято не было.

<sup>3</sup> Данные указывают на то, что оператор, вероятно, перепутал образцы 9 и 10 до подготовки библиотеки.

<sup>4</sup> Положение мутации дикого типа, соответствующее вариации M1V для одной реплики каждого из двух образцов, не распознано из-за недостаточного покрытия.

## Рабочие характеристики модуля Somatic

В описанных здесь исследованиях для анализа данных секвенирования использовали модуль Somatic Variant Module, за исключением тех исследований, в которых применяется панель с двумя генами. В них применяли специальный модуль для конкретного анализа.

### Точность

Чтобы оценить точность прибора MiSeqDx, было проведено три исследования с ДНК, извлеченной из зафиксированных формалином и залитых парафином (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) образцов.

## Исследование 1

Это исследование было выполнено путем репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах с использованием 150 ампликонов. Y-хромосома не содержит доверительных областей, и ее оценку не проводили. Пять уникальных образцов, использованных в этом исследовании, взяты из одной семьи (двое родителей и трое детей) и часто секвенируются в различных лабораториях по различным методологиям секвенирования. Три образца — от женщин, и два — от мужчин. До выделения ДНК для этого исследования все образцы были зафиксированы формалином и залиты парафином. Образец GM12877 разводили на уровне ДНК образцом GM12878, чтобы получить GM12877-D и создать ряд вариаций с частотами приблизительно 5 % и 10 %. Все образцы тестировали с двумя повторениями, за исключением GM12877-D, который тестировали с пятью репликами. Точность определяли для SNV, вставок и делеций посредством сравнения данных исследования с подробно описанной референсной базой данных. Последовательность из референсной базы данных (Platinum Genomes, версия 2016-01) получали посредством комбинации нескольких методологий секвенирования, публично доступных данных и наследственной информации. Доверительные геномные области были определены на основе данного эталонного метода, если не указано иное. Всего запуск образцов проводили восемь раз. Приведенные таблицы с информацией о точности сформированы на основании данных первого запуска.

В [таблице 10](#) приведены данные исследования, представленные с положительной и отрицательной согласованностью для отдельного образца, где результаты вариации сравниваются с подробно описанным эталонным методом анализа состава для расчетов PPA. Представлена совокупность трех типов вариаций (SNV, вставки и делеции). Поскольку эталонный метод позволяет получить результаты только для единичных нуклеотидных вариаций и вставок/делеций, результаты распознавания невариантных оснований сравнивают с результатами секвенирования референсного генома человека в сборке hg19 для расчета NPA.

**таблица 10** Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument с референсными данными по 6 подробно описанным образцам

Образец	Средняя частота распознавания	Общее число вариаций	Общее число TP вариаций	Общее число FN вариаций	Общее число TN распознаваний	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
	98,4				57 608			
GM12877-D <sup>2</sup>		155	155	0		100	100	100

<sup>1</sup> Вариации с частотой выше 20 %.

<sup>2</sup> Вариации с частотой ниже 20 %.

Для различного геномного состава было создано 150 ампликонов. Диапазон GC-состава ампликонов: 26–87 %. Ампликоны также обладали рядом однонуклеотидных (например, поли (А), поли (Т)), динуклеотидных и тринуклеотидных повторов. В анализе использовалось 6 уникальных образцов. Данные были компилированы по ампликонам (таблица 11), чтобы определить влияние геномного состава на процентную долю корректных распознаваний. Процентная доля корректных распознаваний состоит из распознаваний вариации и эталонных распознаваний и составляет менее 100 %, если имеются некорректные распознавания или нераспознавания. Нераспознавания возникают вследствие несоблюдения требований для одного или нескольких фильтров при распознавании вариации (например, недостаточное покрытие). Некорректных распознаваний не было. Число нераспознаваний значительно различалось по ампликонам. GC-состав и несколько взаимодействий с GC-составом были наиболее достоверными прогностическими параметрами нераспознавания. Из 2580 нераспознаваний 2040 (79 %) возникли из-за несоответствия требованиям к покрытию. Ампликоны с GC-составом выше 78 % давали наибольшее число нераспознаваний. Репрезентативный ампликон с GC-составом 78 % дал всего 675 нераспознаваний. Репрезентативный ампликон с 87 % дал всего 1365 нераспознаваний. Покрытие можно увеличить, снизив число загружаемых образцов на проточную ячейку, что позволит получать обнаруживаемые результаты на ампликонах с высоким GC-составом.

таблица 11 Данные по точности на уровне ампликонов

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Вставка-делеция	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли (А) (5), поли (С) (5), вставка-делеция	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Вставка-делеция	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Вставка-делеция	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли (G) (5)	0,69	1215	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли (Т) (10), вставка-делеция	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли (А) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Вставка-делеция	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Вставка-делеция	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/П	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли (А) (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли (Т) (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли (Т) (5), поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/П	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), вставка-делеция	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/П	0,43	1245	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), вставка- делеция	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5), поли (А) (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Вставка- делеция	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли (А) (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли (G) (6), поли (Т) (5), поли (А) (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/П	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли (А) (5), вставка- делеция	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли (А) (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли (А) (7), вставка- делеция	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/П	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/П	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли (А) (6), вставка- делеция	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли (Т) (5)	0,37	1005	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG (3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Вставка-делеция	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли (G) (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Вставка-делеция	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	ГСТ(5), вставка-делеция	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли (Т) (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Вставка-делеция	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли (С) (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли (А) (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/П	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Вставка-делеция	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли (А) (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Вставка-делеция	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,62	1350	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли (G) (6), поли (C) (6), вставка- делеция	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/П	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Вставка- делеция	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/П	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли (G) (7), СТС(4), вставка- делеция	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Вставка- делеция	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли (G) (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Вставка- делеция	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/П	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли (С) (6), вставка- делеция	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли (G) (5), вставка- делеция	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	Поли (Т) (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли (А) (5), поли (Т) (5)	0,2	1350	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
63	10	45084159	45084253	95	95	Вставка-делеция	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), вставка-делеция	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/П	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/П	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/П	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Вставка-делеция	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/П	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Вставка-делеция	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/П	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли (А) (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/П	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли (G) (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Вставка-делеция	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли (А) (5), CA(3), вставка-делеция	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли (А) (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/П	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли (А) (6)	0,35	1065	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли (G) (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Н/П	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли (A) (5), поли (T) (7), поли (A) (7), вставка-делеция	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Вставка-делеция	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Вставка-делеция	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/П	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли (T) (5), вставка-делеция	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Вставка-делеция	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Вставка-делеция	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли (A) (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Вставка-делеция	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли (C) (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Вставка-делеция	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли (T) (6)	0,43	1425	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
98	15	85438263	85438334	72	71	Вставка-делеция	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/П	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Вставка-делеция	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/П	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли (С) (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли (С) (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли (Т) (5), вставка-делеция	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	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Вставка-делеция	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Вставка-делеция	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли (Т) (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли (А) (13), вставка-делеция (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли (А) (5)	0,34	1365	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли (А) (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), вставка-делеция	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Вставка-делеция	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли (Т) (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/П	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), вставка-делеция	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), вставка-делеция	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/П	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/П	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/П	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/П	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/П	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	1140	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), вставка-делеция	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Вставка-делеция	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Вставка-делеция	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли (G) (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Вставка-делеция	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Вставка-делеция	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли (T) (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), вставка-делеция	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли (A) (6), AG(3), вставка-делеция	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли (T) (5), поли (A) (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Вставка-делеция	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/П	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Вставка-делеция	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/П	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Вставка-делеция	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли (T) (5)	0,26	1035	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли (C) (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/П	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	Н/П
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	Н/П
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли (A) (5)	0,37	0	0	0	Н/П

Вариации, которые не были распознаны, представлены в [таблице 12](#). В таблице представлены конкретные фильтры, из-за которых возникли нераспознавания.

таблица 12 Сводная таблица по нераспознаваниям вариаций

Номер ампликона	Хромосома:позиция	Вариация	Состав соответствующего ампликона	Фильтр	Пропущенные вариации	Ожидаемое число вариаций
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP <sup>1</sup>	8	13
52	8:24811064	AG > A	Поли (G) (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	Поли (GC) (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	Поли (A) (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP — низкое покрытие. Вариация фильтруется, если глубина хотя бы в одном из пулов в этой конкретной позиции ниже 900.

<sup>2</sup> R3x6 — фильтр повторов. Вариация фильтруется, если вся или часть вариации наблюдается повторно в референсном геноме, прилегающем к позиции вариации. Требуется не менее шести повторов в референсном геноме, при этом учитываются только повторы длиной до 3 п. о.

Результаты секвенирования образца сравнили с параметрами генотипа NA12878 с высокой степенью достоверности, установленными Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Из 150 ампликонов 92 полностью содержались внутри геномных участков с высокой степенью достоверности, 41 ампликон имел частичное наложение, и 17 ампликонов не имели наложения в последовательности NIST. В результате получено 10 000 координат на одну повторность для сравнения. Невариантные распознанные основания сравнили с последовательностью референсного генома в сборке hg19. Результаты анализа точности приведены в [таблице 13](#).

**таблица 13** Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument с референсным геномом NIST для образца GM12878

Образец	Число ампликонов	Средняя частота распознавания	Общее число TP распознаваний вариаций	Общее число FN распознаваний вариаций	Общее число TN распознаваний	Общее число FP распознаваний	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19 231	0	100	100	100

Затем пять неразведенных образцов были проанализированы для распознавания малых вставок и делеций (вставок-делеций) (таблица 14). В некоторых случаях вставка-делеция была общей для двух или более образцов, как показано в столбце «Общее число реплик образца со вставкой-делецией». Результаты для обеих реплик пяти образцов представлены в таблице 14. Была обнаружена всего 71 вставка-делеция размером от 1 до 24 п. о. (вставки) и от 1 до 25 п. о. (делеции). Каждая из 68 вставок-делеций была обнаружена с показателем согласованности положительных результатов 1. У трех вставок и делеций не было корректных распознаваний, поскольку каждая из этих вариаций была нераспознанной из-за фильтра R3x6. Поэтому PPA, которая исключает нераспознавания, не могла быть рассчитана. Тремя вариациями были делеция 1 п. о. (chr8 24811064 AG>A), делеция 2 п. о. (chr10 55892600 TAC>T) и вставка 1 п. о. (chr17 39589692 C>CA).

**таблица 14** Сводная информация об обнаружении вставок-делеций прибором MiSeqDx Instrument

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
1	1	36450544	93	Делеция 25 п. о.	GAAAATTTAATGAAACACATTGCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Делеция 3 п. о.	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Вставка 23 п. о.	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Делеция 17 п. о.	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Вставка 5 п. о.	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Вставка 3 п. о.	C>CATG	9	0	0	9	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
8	2	55862804	90	Вставка 7 п. о.	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Делеция 6 п. о.	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Вставка 5 п. о.	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Вставка 12 п. о.	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Вставка 2 п. о.	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Делеция 23 п. о.	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Вставка 9 п. о.	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Делеция 1 п. о.	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Делеция 8 п. о.	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Вставка 11 п. о.	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Делеция 4 п. о.	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Вставка 8 п. о.	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Делеция 21 п. о.	CCCTGGGTGCTATAGCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Делеция 3 п. о.	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Делеция 25 п. о.	CTTTCACITTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Делеция 23 п. о.	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
44	7	66276142	88	Вставка 1 п. о.	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Делеция 4 п. о.	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Вставка 1 п. о.	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Делеция 4 п. о.	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Делеция 11 п. о.	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	Делеция 1 п. о.	AG>A	15	15	0	0	Н/П
53	8	76518677	67	Вставка 4 п. о.	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Вставка 4 п. о.	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Делеция 21 п. о.	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Делеция 3 п. о.	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Делеция 16 п. о.	AGCGTCTATAACCAAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Делеция 2 п. о.	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Вставка 2 п. о.	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Вставка 8 п. о.	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Делеция 8 п. о.	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Делеция 2 п. о.	CTT>C	11	0	0	11	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
78	12	2834814	84	Вставка 21 п. о.	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Вставка 19 п. о.	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Вставка 4 п. о.	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Делеция 20 п. о.	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Делеция 22 п. о.	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Вставка 4 п. о.	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Делеция 16 п. о.	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Делеция 5 п. о.	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Делеция 6 п. о.	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Делеция 25 п. о.	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA> G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Вставка 3 п. о.	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Вставка 4 п. о.	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Делеция 7 п. о.	ATTATTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Делеция 1 п. о.	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Вставка 18 п. о.	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Вставка 4 п. о.	A>AACAC	7	0	0	7	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
111	17	39589692	84	Вставка 1 п. о.	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Вставка 24 п. о.	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Делеция 4 п. о.	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Делеция 12 п. о.	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Вставка 22 п. о.	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Вставка 3 п. о.	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Делеция 2 п. о.	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Делеция 15 п. о.	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Вставка 5 п. о.	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Вставка 11 п. о.	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Делеция 16 п. о.	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Вставка 11 п. о.	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Делеция 21 п. о.	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Делеция 5 п. о.	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Вставка 6 п. о.	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Вставка 5 п. о.	C>CTGTTT	13	0	0	13	100

Ампликон	Хромосома	Положение	Размер анализируемого фрагмента	Тип и длина вставки-делеции ампликона	Вставка-делеция	Общее число реплик образца со вставкой-делецией	Число нераспознаваний	Общее число некорректных распознаваний вставок-делеций	Общее число корректных распознаваний вставок-делеций	PPA
144	22	47081407	92	Делеция 10 п. о.	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## Исследование 2

В этом исследовании использовались образцы тканей колоректального рака FFPE из банка и репрезентативный анализ на два гена, который сравнивали с эталонным методом, двунаправленным секвенированием по Сэнгеру (метод Сэнгера). У 441 из 1183 участников были действительные результаты анализа по методу Сэнгера и репрезентативного анализа. При оценке на уровне участников (таблица 15) у 230 из 441 участника были положительные результаты анализа по методу Сэнгера (мутация, выявленная методом Сэнгера). Из них у 227 участников были положительные результаты репрезентативного анализа. У остальных 211 из 441 участника анализ по методу Сэнгера дал отрицательные результаты (отсутствие мутации, выявленной методом Сэнгера). Из них у 206 участников получены отрицательные результаты в ходе репрезентативного анализа. Это позволило получить показатель согласованности положительных результатов (PPA, Positive Percent Agreement) 98,7 % и показатель согласованности отрицательных результатов (NPA, Negative Percent Agreement) 97,6 % (таблица 15).

таблица 15 Показатели согласованности положительных и отрицательных результатов на уровне участников

Репрезентативный анализ	Метод Сэнгера		Всего
	Положительный	Отрицательный	
Положительный	227 <sup>1</sup>	5	232
Отрицательный	3 <sup>2</sup>	206	209
Всего	230	211	441

Эффективность Резюме		
Согласованность Статистика	Точечная оценка	Точный 95 % ДИ

Репрезентативный анализ	Метод Сэнгера		Всего
	Положительный	Отрицательный	
	Эффективность Резюме		
Согласованность Статистика	Точечная оценка	Точный 95 % ДИ	
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %,99,7 %]	
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %,99,2 %]	

<sup>1</sup>По результатам в пределах одного участника и на уровне всех мутаций было 224 точных совпадения. У двух участников прибор MiSeqDx позволил обнаружить мутацию, выявленную методом Сэнгера, и одну дополнительную мутацию. У одного участника прибор MiSeqDx и анализ по методу Сэнгера выявили различные мутации.

<sup>2</sup>У одного участника было две мутации, выявленные методом Сэнгера. У двух участников была одна мутация, выявленная методом Сэнгера.

### Исследование 3

В этом исследовании оценивали библиотеки ДНК, подготовленные с образцами FFPE из нескольких типах тканей. Всего использовали 109 образцов FFPE из восьми разных тканей (толстая кишка, яичник, поджелудочная железа, надпочечник, мочевого пузырь, печень, щитовидная и молочная железы), при этом каждый тип ткани представляли минимум 11 образцов FFPE. В ткани надпочечника также были метастазы от опухолей пищевода, легких и толстой кишки. В остальных тканях были первичные опухоли. Исследование было выполнено путем репрезентативного анализа, предназначенного для поиска 26 генов, покрывающих 21 577 оснований в 17 различных хромосомах. Всего шесть различных генов (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* и *BRAF*) были секвенированы по Сэнгеру, при этом в каждой опухоли 1–3 гена были секвенированы по Сэнгеру на основании ожидаемой распространенности соматических мутаций для данной опухоли. Секвенирование по Сэнгеру выявило 39 соматических мутаций SNV в 33 из 109 образцов FFPE. Прибор MiSeqDx выявил 36 соматических мутаций SNV в 32 из 109 образцов FFPE с одним ложноположительным результатом и двумя нераспознаваниями позиций вариации. PPA составила 97,3 %. Прибор MiSeqDx выявил 78 975 референсных оснований в 109 образцах FFPE с 29 ложноположительными результатами в сопоставлении с секвенированием по Сэнгеру и 2437 нераспознаваний. NPA составила 99,9 %. Делеция двух оснований была сопоставимой в двух методах. В [таблице 16](#) кратко изложены результаты по типам тканей.

таблица 16 Показатель согласованности положительных и отрицательных результатов по типам тканей

Тип ткани	Число образцов	Общее число вариаций	Общее число TP вариаций	Общее число FN вариаций	Общее число TN распознаваний	Общее число FP распознаваний	Общее число нераспознаваний	PPA	NPA
Надпочечник	16	6	4	1	11 823	2	607	80	>99,9
Мочевой пузырь	12	4	4	0	7070	3	273	100	>99,9
Молочная железа	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Толстая кишка	11	6	5	0	8720	2	133	100	>99,9
Печень	13	3	3	0	7984	1	59	100	>99,9
Яичник	13	7	7	0	10 581	1	724	100	>99,99
Поджелудочная железа	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Щитовидная железа	11	3	3	0	7429	1	652	100	>99,9
Всего	109	39	36	1	78 974	29	3416	97,3	>99,9

## Воспроизводимость

Чтобы оценить воспроизводимость результатов, полученных на приборе MiSeqDx, было проведено два исследования с ДНК, извлеченной из образцов FFPE. В исследовании 1 использовалось несколько приборов. В исследовании 2 участвовало несколько центров.

### Исследование 1

Воспроизводимость результатов, полученных на приборе MiSeqDx, определяли на двух приборах при работе двух квалифицированных операторов; всего восемь запусков. Репрезентативный анализ, геномный контекст ампликона, образцы и эталонный метод являются такими же, как и описанные для исследования точности в исследовании 1 выше. Результаты представлены по каждому ампликону для каждого прибора (таблица 17) и демонстрируют воспроизводимость распознавания на разных приборах. Процентная доля корректных распознаваний включала как некорректные распознавания, так и нераспознавания (вследствие несоблюдения требований для одного или нескольких фильтров при распознавании вариации). Приборы давали сопоставимое число нераспознаваний в зависимости от конкретного ампликона. Для прибора MiSeqDx 1 наблюдалось одно некорректное распознавание в доверительной области, определенное референсными геномами Platinum Genomes. Некорректное распознавание было ложноположительным распознаванием вариации вставки в ампликоне 64 при изучении хромосомы 10 в позициях 55892599–55892687. У ампликона был динуклеотидный повтор 11.

таблица 17 Результаты по воспроизводимости от одного тестируемого прибора к другому для прибора MiSeqDx Instrument (уровень ампликонов)

Ампли-кон	Хромосо-ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
1	1	93	93	Вставка-делеция	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	Поли (А) (5), поли (С) (5), вставка-делеция	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Вставка-делеция	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Вставка-делеция	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	Поли (G) (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	Поли (Т) (10), вставка-делеция	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	Поли (А) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Вставка-делеция	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Вставка-делеция	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Н/П	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	Поли (А) (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
12	2	88	88	Поли (Т) (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	Поли (Т) (5), вставка- делеция	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	Поли (Т) (5), поли (А) (6), вставка- делеция	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Н/П	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	Поли (Т) (5), вставка- делеция	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	АТ(3), вставка- делеция	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Н/П	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	СТ(3), вставка- делеция	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5), поли (А) (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Вставка- делеция	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	Поли (А) (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
23	4	97	97	Поли (G) (6), поли (T) (5), поли (A) (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Н/П	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	Поли (A) (5), вставка- делеция	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	Поли (A) (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	Поли (A) (7), вставка- делеция	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Н/П	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	Н/П	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	Поли (A) (6), вставка- делеция	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	Поли (T) (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Вставка- делеция	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	Поли (G) (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
36	6	92	92	Вставка- делеция	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	ГСТ(5), вставка- делеция	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Поли (Т) (5), ТСТ(3), СТТ(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Вставка- делеция	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	Поли (С) (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	Поли (G) (5), вставка- делеция	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	Поли (А) (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Н/П	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Вставка- делеция	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	Поли (А) (7), АG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Вставка- делеция	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	Поли (G) (5), вставка- делеция	0,62	5398	0	2	5399	0	1

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
48	7	91	91	Поли (G) (6), поли (C) (6), вставка- делеция	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Н/П	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Вставка- делеция	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Н/П	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	Поли (G) (7), CTC(4), вставка- делеция	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Вставка- делеция	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	Поли (G) (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Вставка- делеция	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Н/П	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	Поли (C) (6), вставка- делеция	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	Поли (G) (5), вставка- делеция	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
61	10	79	79	Поли (Т) (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	Поли (А) (5), поли (Т) (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Вставка- делеция	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	АС(11), вставка- делеция	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Н/П	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Н/П	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Н/П	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Вставка- делеция	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Н/П	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Вставка- делеция	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Н/П	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	Поли (А) (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Н/П	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	Поли (G) (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Вставка- делеция	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Поли (А) (5), СА(3), вставка- делеция	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0

Ампликон	Хромосома	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
78	12	84	84	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	Поли (А) (7), АС(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Н/П	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	Поли (А) (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	Поли (G) (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Н/П	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	Поли (А) (5), поли (Т) (7), поли (А) (7), вставка-делеция	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Вставка-делеция	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Вставка-делеция	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), ТА (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Н/П	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Вставка-делеция	0,38	4860	0	2	4860	0	0

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
91	14	91	91	Вставка- делеция	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	Поли (А) (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Вставка- делеция	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	Поли (С) (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Вставка- делеция	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	Поли (G) (5), вставка- делеция	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	Поли (Т) (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Вставка- делеция	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Н/П	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Вставка- делеция	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Н/П	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	Поли (С) (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	ТА(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	Поли (С) (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	Поли (Т) (5), вставка- делеция	0,37	5443	0	17	5444	0	16

Ампликон	Хромосома	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Вставка-делеция	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Вставка-делеция	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	Поли (Т) (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Поли (А) (13), вставка-делеция (×2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	Поли (А) (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	Поли (А) (7), АТ(3), АТ(4), АТ(4), вставка-делеция	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Вставка-делеция	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	Поли (Т) (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Н/П	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
120	18	75	75	Поли (А) (5), вставка- делеция	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	СТС(3), вставка- делеция	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	СТ(3), вставка- делеция	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Н/П	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Н/П	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Н/П	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Н/П	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Н/П	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	АС(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	СТ(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG (4), вставка- делеция	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Вставка- делеция	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Вставка- делеция	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	Поли (G) (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Вставка- делеция	0,57	5218	0	2	5218	0	2

Ампли- кон	Хромосо- ма	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC- состав	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний	Общее число корректных распознаваний	Общее число некорректных распознаваний	Общее число нераспознаваний
135	21	66	66	Вставка- делеция	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	Поли (Т) (6), СА(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), вставка- делеция	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	Поли (А) (6), AG(3), вставка- делеция	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	Поли (Т) (5), поли (А) (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Вставка- делеция	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Н/П	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Вставка- делеция	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Н/П	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Вставка- делеция	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	Поли (Т) (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	Поли (С) (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Н/П	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	Поли (А) (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Результаты исследования воспроизводимости были проанализированы для каждого оператора с использованием частоты вариаций (таблица 18). Этот анализ показал, что частоты вариаций были единообразны у разных операторов. Представлены средние значения по частотам вариаций  $\pm 1$  стандартное отклонение.

таблица 18 Результаты от оператора к оператору для прибора MiSeqDx Instrument

Диапазон частот вариаций	Число уникальных вариаций	Общее число проанализированных вариаций, оператор 1	Общее число проанализированных вариаций, оператор 2	Среднее заявленное значение частоты вариаций (CO), оператор 1	Среднее заявленное значение частоты вариаций (CO), оператор 2
Высокая частота (~ 100 %)	1112	1072	1072	0,96 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,05
Средняя частота (~ 50 %)	3240	3151	3161	0,49 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,04
Низкая частота (3–7 %)	620	618	612	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01

Результаты исследования воспроизводимости по каждому образцу представлены в совокупности со всех восьми запусков (таблица 19). Обнаружение оценивают для каждого типа вариации — SNV, вставок и делеций — отдельно. Референсные позиции исключены. Этот анализ показал, что результаты для вариаций были воспроизводимыми по всем образцам.

таблица 19 Согласованность результатов по распознаванию оснований прибором MiSeqDx Instrument по каждому образцу

Образец	SNV				Вставки				Делеции			
	Всего	Всего TP	Всего FP	Всего FN	Всего	Всего TP	Всего FP	Всего FN	Всего	Всего TP	Всего FP	Всего 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 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup>Вариации с частотой выше 20 %.

<sup>2</sup>Вариации с частотой ниже 20 %.

Данные, полученные по восьми запускам в этом исследовании воспроизводимости, подтверждают заявление о том, что при секвенировании на приборе MiSeqDx можно получать согласующиеся результаты:

- GC-состав  $\geq 19\%$  (все распознанные основания в 120 из 120 секвенированных ампликонов с GC-составом в объеме 19 %, распознанных корректно с частотой нераспознавания 3,4 %);
- GC-состав  $\leq 73\%$  (все распознанные основания в 120 из 120 секвенированных ампликонов с GC-составом в объеме 73 %, распознанных корректно с частотой нераспознавания 0,1 %);
- значения длин хвостов поли (A)  $\leq 8$  (повтор поли (A) восьми нуклеотидов был распознан корректно в 120 из 120 секвенированных ампликонов, содержащих поли (A) = 8);
- значения длин хвостов поли (T)  $\leq 10$  (повтор поли (T) десяти нуклеотидов был распознан корректно в 120 из 120 секвенированных ампликонов, содержащих поли (T) = 10);
- значения длин хвостов поли (G)  $\leq 6$  (повтор поли (G) шести нуклеотидов был распознан корректно в 720 из 720 секвенированных ампликонов, содержащих поли (G) = 6);

- значения длин хвостов поли (C)  $\leq 6$  (повтор поли (C) шести нуклеотидов был распознан корректно в 359 из 360 секвенированных ампликонов, содержащих поли (C) = 6, с одним нераспознаванием);
- значения длин динуклеотидного повтора  $\leq 4x$  (все распознанные основания в 600 из 600 секвенированных ампликонов, содержащих динуклеотидные повторы размером 4x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,4 %);
- значения длин тринуклеотидного повтора  $\leq 5x$  (все распознанные основания в 120 из 120 секвенированных ампликонов, содержащих тринуклеотидные повторы размером 5x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 1,9 %);
- 24 или менее вставок оснований и 25 или менее делеций оснований:
  - вставки 24 оснований, распознанные корректно в 120 из 120 образцов;
  - делеции 25 оснований, распознанные корректно в 182 образцах и заявленные как нераспознанные в двух образцах из 184.

## Исследование 2

Для оценки воспроизводимости репрезентативного анализа на два гена, описанного в исследовании точности 2, было проведено дополнительное исследование в трех исследовательских центрах (по два оператора на центр), в нем использовали реагенты из одной партии, а проводили его в течение трех непоследовательных дней тестирования. Тестирование проводили с использованием шести подробно охарактеризованных панелей образцов геномной ДНК из клинических образцов FFPE или клеточных линий. Каждая панель состояла из десяти представителей. Всего — 60 представителей по всем панелям.

У этих 60 представителей были повторности четырех уникальных образцов дикого типа (для мутаций панели), 12 уникальных мутантных образцов (с одной мутацией), подготовленных как при высокой, так и низкой частоте мутаций, и два уникальных мутантных образца (с одной мутацией), подготовленных только при низкой частоте мутаций. У каждого уникального образца / образца с каждой частотой мутаций (протестированных в двух повторностях в каждом запуске) было 36 возможных результатов (2 повторности  $\times$  2 оператора  $\times$  3 дня  $\times$  3 центра), если все результаты были действительными.

Процент ожидаемых распознаваний (PEC, Percent Expected Call) по всем положительным и отрицательным вариациями оценивали сравнением результата репрезентативного анализа с ожидаемым результатом мутации (ожидаемая выявленная или невыявленная мутация) в каждом образце. PEC рассчитывается как 100 %, умноженное на число ожидаемых распознаваний, деленное на число предпринятых распознаваний. Двусторонний 95%-й доверительный интервал рассчитывается по методу Уилсона.

По всем центрам показатель успешного прохождения образцов составил  $\geq 94,7\%$  для первого запуска образца или у образцов, протестированных в запусках, которые были действительными при первом прохождении. PEC на уровне мутаций по всем мутантным образцам составил  $99,6\%$  ( $905/909$ ) ( $95\%$ -й ДИ;  $98,9, 99,8$ ). Число предпринятых распознаваний по всем 56 мутациям панелей (независимо от того, была ли выявленная мутация ожидаемой или нет) для всех действительных образцов составило  $58\,856$  ( $56 \times 1051$ ). Из этих  $58\,856$  наблюдаемых результатов на уровне мутаций было всего шесть случаев, когда наблюдаемые и ожидаемые результаты не совпали. PEC на уровне мутаций по всем положительным и отрицательным вариациям от всех представителей панели с мутациями и дикого типа вместе составил  $99,99\%$  ( $58\,850 / 58\,856$ ).

## Аналитическая чувствительность (предел холостой пробы [LoB] и предел обнаружения [LoD])

В этом исследовании проверяли ограничение анализа и устанавливали предел обнаружения (LoD, Limit of Detection) для прибора MiSeqDx при использовании репрезентативной панели. Вкратце, подробно охарактеризованные клеточные линии Platinum Genome GM12878 и GM12877 были зафиксированы формалином и залиты парафином, а затем из них выделили ДНК. Линия GM12878 была разведена линией GM12877 так, чтобы частоты вариаций для 70 вариаций (52 SNV, девять вставок и девять делеций) составляли приблизительно  $0,05$ . Два образца ДНК тестировали два оператора на двух приборах, используя две партии реагентов всего в десяти запусках секвенирования на приборе MiSeqDx. В результате получено 40 реплик для каждой вариации в GM12878 и 60 реплик для каждой соответствующей координаты дикого типа в GM12877 для каждой партии реагентов. Значения LoB и LoD вычислены с применением классического подхода, указанного в CLSI EP17-A2, с применением непараметрического метода. Значения LoB и LoD были рассчитаны для SNV, вставок и делеций отдельно путем объединения частот вариаций для заданного типа вариации. Ошибка типа I была определена как  $0,01$ , ошибка типа II была определена как  $0,05$ .

Для значения LoB частоты объединенных вариаций были отсортированы от низшей к высшей. Была рассчитана позиция 99-го ранга для каждой партии реагента для каждого типа вариации (таблица 20). Для программного обеспечения MiSeqDx используется ограничение (эффективное значение LoB) частоты вариаций  $0,026$  для количественного определения вариаций. Рассчитанный предел холостой пробы подтверждает, что данное ограничение приводит к ошибке типа I, составляющей не более  $0,01$ .

таблица 20 Предел холостой пробы

Тип вариации	Общее число частот вариаций	Значение LoB партии реагента 1 (%)	Значение LoB партии реагента 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75

Тип вариации	Общее число частот вариаций	Значение LoB партии реагента 1 (%)	Значение LoB партии реагента 2 (%)
Вставка	540	0,79	0,60
Делеция	540	0,96	0,84

Для значения LoD была рассчитана процентная доля индивидуальной частоты мутаций для каждой партии реагентов для каждого типа вариации ниже предельного значения 0,026 (таблица 21). Поскольку процентные доли составляли меньшее значение, чем ошибка типа II 5 % (0,05), медиану объединенных частот вариантов рассчитывали как значение LoD (таблица 22). Значение LoD для каждого типа вариации принимали как большее из двух значений, рассчитанных для двух партий реагентов: 5,45 % для SNV, 4,88 % для вставок и 5,44 % для делеций.

таблица 21 Предел обнаружения

Партия реагентов	Тип вариации	Общее число частот вариаций	Число измерений VF < 2,6 %	Процентная доля измерений VF < 2,6 %	Предел обнаружения (%)
1	SNV	2080	5	0,20	5,45
	Вставка	360	0	0,00	4,86
	Делеция	360	3	0,80	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Вставка	360	0	0,00	4,88
	Делеция	360	0	0,00	5,24

Следующие исследования демонстрируют рабочие характеристики прибора MiSeqDx с другим репрезентативным анализом, нацеленным на 56 мутаций в двух клинически значимых раковых генах (панель мутаций). Панель мутаций специально разработана для обнаружения 56 мутаций в двух клинически значимых раковых генах (ген 1 и ген 2). Анализ одновременно определяет наличие или отсутствие каждой из 56 мутаций в каждом секвенированном образце. Референсным методом для этих исследований было двунаправленное секвенирование по Сэнгеру.

## Прецизионность от партии к партии

Чтобы оценить рабочие характеристики прибора MiSeqDx с различными произведенными партиями наборов реагентов (состоящих из реагентов для квалификации образцов, подготовки библиотек и секвенирования), было проведено исследование на прецизионность от партии к партии с помощью репрезентативного анализа на два гена с использованием панели из пяти смешанных образцов FFPE, отвечающих требованиям к квалификации образцов. Каждый образец FFPE содержал две уникальные мутации: одну с низкой (приблизительно 8 %) частотой мутаций и одну с высокой (приблизительно 14 %) частотой мутаций. В течение трех не последовательных дней с использованием трех партий наборов реагентов провели 12 наблюдений каждой из пяти смесей образцов. Всего в исследовании по всем партиям реагентов было сделано 180 наблюдений для всех смесей образцов и 360 наблюдений для всех частот мутаций. Во всех партиях и во все дни 99,7 % (359/360) наблюдений показали ожидаемый результат в отношении мутации. Одна мутация с низкой частотой была некорректно распознана как дикий тип. Чтобы оценить изменчивость системы, для каждой частоты мутации выполняли анализ компонента дисперсии. Общее стандартное отклонение варьировало от 0,011 до 0,029. Компонент партии реагентов в общем стандартном отклонении варьировал от 0 до 0,015.

# История изменений

№ документа	Дата	Описание изменений
№ документа 200006218, версия 01	Май 2022 г.	Добавлен листок-вкладыш CN по набору реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro в раздел «Необходимое оборудование и материалы (в комплект не входят)». Добавлена информация о тестировании по набору реагентов MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro в раздел «Рабочие характеристики». Из раздела «Предупреждения и меры предосторожности» удалено уведомление об осторожности для США.
№ документа 200006218, версия 00	Ноябрь 2021 г.	Первоначальный выпуск на поддержку MOS v4.0 и Local Run Manager v3.0.

# Патенты и товарные знаки

Настоящий документ и его содержание являются собственностью компании Illumina, Inc. и ее аффилированных лиц (Illumina) и предназначены для использования исключительно в рамках договора заказчиком при эксплуатации изделия (-й), описанного (-ых) в настоящем документе, и ни для какой иной цели. Настоящий документ и его содержание не подлежат использованию или распространению не по назначению и (или) передаче, раскрытию или воспроизведению каким-либо способом без предварительного письменного согласия компании Illumina. Настоящим документом компания Illumina не передает никаких лицензий на свои патенты, товарные знаки, авторские права или права, признаваемые общим правом, или аналогичные права третьих лиц.

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделий, описанных в настоящем документе. Перед началом использования такого изделия (-ий) необходимо в полном объеме прочесть и усвоить всю информацию, представленную в настоящем документе.

**НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЙ, ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА И ПРИВЕДЕТ К ОТМЕНЕ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ, ПРИМЕНИМЫХ К ИЗДЕЛИЯМ.**

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕТ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЙ, ОПИСАННЫХ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ЧАСТИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

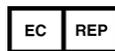
© Illumina, Inc., 2022. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте по адресу [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Контактная информация



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A. (США)  
+1-800-809-ILMN (4566)  
+1 858 202-45-66 (за пределами Северной Америки)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
The Netherlands (Нидерланды)

# Маркировка изделия

Полная информация о символах, которые могут быть изображены на упаковке и этикетке изделия, представлена в описании условных обозначений для вашего набора по адресу [support.illumina.com](http://support.illumina.com).