

## Upute za instrumente sa sustavom MOS v4

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU. SAMO ZA IZVOZ.

### Namjena

Instrument MiSeqDx namijenjen je za ciljano sekvenciranje biblioteka DNK-a iz ljudskog genomskeg DNK-a izdvojenog iz periferne pune krvi ili tkiva fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafinske blokove (FFPE) kada se upotrebljavaju u *in vitro* dijagnostičkim (IVD) analizama na instrumentu. Instrument MiSeqDx nije namijenjen za sekvenciranje cijelog genoma ni za sekvenciranje *de novo*. Namjena je instrumenta MiSeqDx da se upotrebljava s registriranim, odobrenim reagensima za IVD i analitičkim softverom odnosno onima sa službenih popisa.

### Načela postupka

MiSeqDx tvrtke Illumina nije namijenjen za ciljano ponovno sekvenciranje ljudskog DNK-a uz pomoć potrošnog materijala tvrtke Illumina i biblioteka pripremljenih od ljudskog genomskeg DNK-a izdvojenog iz periferne pune krvi ili FFPE tkiva uz upotrebu registriranih, provjerenih ili odobrenih reagensa za IVD odnosno onih sa službenih popisa. Biblioteke se pripremaju amplifikacijom ciljnih vrijednosti te dodavanjem indeksa uzorka i sekvenci koje se prikupljaju. Biblioteke uzoraka izrađuju se na protočnom članku instrumenta i sekvenciraju na instrumentu pomoću kemijskog postupka sekvenciranja sintezom (SBS). U kemijskom postupku SBS upotrebljava se metoda reverzibilnog terminatora za otkrivanje jednonukleotidnih baza dok se umeću u rastuće DNK lance. Softver Real-Time Analysis (RTA) analizira slike i očitava baze te svakoj bazi za svaki ciklus sekvenciranja dodjeljuje ocjenu kvalitete. Po dovršetku primarne analize, na instrumentu MiSeqDx sekundarnom se analizom obrađuju prepoznavanja baza.

Obrada obično obuhvaća demultipleksiranje, generiranje FASTQ datoteke, poravnanje, prepoznavanje varijanti i generiranje datoteka za prepoznavanje varijante (eng. variant call format, VCF) koje sadrže informacije o varijantama pronađenima na određenim položajima u referentnom genomu. MiSeqDx upotrebljava različite module za sekundarnu analizu, ovisno o tijeku rada.

### Konfiguracija dva načina pokretanja sustava

Konfiguracija dva načina pokretanja sustava obuhvaća hardver, softver i postupke instalacije koji instrumentu MiSeqDx omogućuju provođenje analiza sekvenciranjem za *in vitro* dijagnostiku (IVD) i samo u istraživačke svrhe. Konfiguracija dva načina pokretanja sustava korisniku omogućuje prelazak iz dijagnostičkog načina rada instrumenta u istraživački i obrnuto. Radiofrekvencijski identifikatori (RFID-ovi) na potrošnom materijalu za sekvenciranje sprječavaju upotrebu reagensa za sekvenciranje koji su namijenjeni isključivo za istraživačke svrhe u obradama za dijagnostičko sekvenciranje.

## Ograničenja postupka

- Za *in vitro* dijagnostiku.
- Rezultati predstavljeni na oznakama dobiveni su od reprezentativnih panela za analizu uz upotrebu periferne pune krvi ili linija stanica za radne karakteristike za spolne stanice i FFPE tkiva ili FFPE linija stanica za radne karakteristike za somatske stanice uz upotrebu opisanih reagensa i softverskih modula. Germline Variant Module i Somatic Variant Module razvijeni su za procjenu radnih karakteristika uz reprezentativne analize. Radne karakteristike navedene su samo u informativne svrhe. Predstavljeno testiranje radi validacije služi samo kao primjer općih mogućnosti instrumenta, a ne za utvrđivanje mogućnosti ili prikladnosti instrumenta u vezi s nekom konkretnom tvrdnjom. Za sve dijagnostičke testove razvijene za upotrebu na ovom instrumentu potrebno je provesti potpunu validaciju svih vidova rada.
- Proizvod je ograničen na sljedeće rezultate:
  - izlazni rezultat sekvenciranja  $\geq 5$  Gb pri duljini očitavanja 2 x 150 bp
  - očitavanja koja prolaze filter  $\geq 15$  milijuna pri duljini očitavanja 2 x 150 bp
  - baze ocjene veće od Q30  $\geq 80$  % pri duljini očitavanja 2 x 150 bp.  
Baze jednake ili veće od 80 % imaju ocjene kvalitete na ljestvici Phred veće od 30, što upućuje na točnost prepoznavanja baza veću od 99,9 %.
- Instrument MiSeqDx validiran je samo za sekvenciranje biblioteka ljudskog DNK-a izdvojenog iz periferne pune krvi ili FFPE tkiva. Biblioteke generirane od drugih vrsta uzoraka ne smiju se upotrebljavati na ovom instrumentu za *in vitro* dijagnostiku. Radne karakteristike instrumenta za sekvenciranje mikrobnih ili virusnih nukleinskih kiselina iz kliničkih uzoraka nisu utvrđene.
- MiSeqDx je namijenjen za *in vitro* dijagnostiku uz upotrebu registriranih, provjerenih ili odobrenih reagensa ili analiza za IVD. Ograničenja reagensa i radne karakteristike opisane u ovim uputama utemeljene su na reprezentativnim analizama i softverskim modulima. Informacije o namjeni analiza za IVD, varijantama koje se otkrivaju i vrstama uzoraka potražite u uputama za konkretnu analizu.
- Softver za analizu nije kalibriran za sadržaj indela (insercije, delecije i njihove kombinacije) dulji od 25 bp. Zbog toga softver za analizu ne može otkriti indele dulje od 25 bp.
- Kad se upotrebljava sa softverom Germline Variant Module i Somatic Variant Module, sustav je validiran za otkrivanje jednonukleotidnih varijanti (SNV-ova) i do 25 bp delecija te 24 bp insercija. Za prepoznavanje somatskih stanica pri frekvenciji varijanti 0,05 otkriveno je 25 bp delecija i 18 bp insercija.
- Moguće je da čitanja amplikona ekstremnog sadržaja varijanti nisu kalibrirana u softveru za analizu, što znači da će ta područja biti prijavljena kao područja divljeg tipa. Takvi ekstremni sadržaju uključuju:
  - čitanja koja obuhvaćaju više od tri indela
  - čitanja duljine najmanje 30 bp sa sadržajem jednonukleotidnih varijanti većim od 4 % ukupne ciljne duljine amplikona (bez probnih područja)
  - čitanja duljine manje od 30 bp sa sadržajem jednonukleotidnih varijanti većim od 10 % ukupne ciljne duljine amplikona (s probnim područjima).

- Možda će velike varijante, uključujući višenukleotidne varijante (MNV-ove) i velike indele, u izlaznoj VCF datoteci biti prepoznate kao zasebne manje varijante.
- Delecijske varijante mogu se filtrirati ili preskočiti kad se protežu kroz dva popločana amplikona ako je duljina delecije veća od preklapanja između popločanih amplikona ili jednaka njemu.
- Sustav ne može prepoznati indele ako se pojave izravno uz primer, a nema preklapajućeg amplikona. U područjima s amplikonima koji se preklapaju analiza ne može prepoznati brisanja kad je područje preklapanja manje od veličine brisanja koje treba prepoznati. Primjerice, ako područje preklapanja između dvaju susjednih amplikona čine dvije (2) baze, analiza ne može prepoznati nijednu deleciju koja uključuje obje baze. Brisanje sa samo jednom bazom na mjestu bilo koje od tih baza može se prepoznati.
- Kao i u svakom drugom tijeku rada za pripremu biblioteke utemeljene na hibridizaciji, pozadinski polimorfizmi, mutacije, insercije ili delecije u regijama koje vežu oligonukleotide mogu utjecati na alele koje se ispituju. To, posljedično, utječe i na prepoznavanja tijekom sekvenciranja. To obuhvaća primjerice sljedeće:
  - Varijanta u fazi s varijantom u području primera možda neće biti amplificirana, što će uzrokovati lažno negativan rezultat.
  - Varijante u području primera mogu spriječiti pojačanje referentne alele, što će uzrokovati netočno prepoznavanje homozigotne varijante.
  - Varijante indela u području primera mogu na kraju čitanja neposredno uz primer uzrokovati lažno pozitivno prepoznavanje.
- Indeli se mogu filtrirati zbog pristranosti niza ako se pojave pri kraju jednog čitanja i meko se „odrežu“ (eng. soft clipping) tijekom kalibracije.
- Male višenukleotidne varijante nisu validirane.
- Varijante s kopijama i strukturne varijante, kao što su fuzije ili translokacije, nisu validirane.
- Ograničenja specifična za linije spolnih stanica:
  - Sustav MiSeqDx s modulom Germline Variant Module namijenjen je za dobivanje kvalitativnih rezultata za prepoznavanje varijanti linija spolnih stanica (npr. homozigotne, heterozigotne, divljeg tipa).
  - Kad se upotrebljava s modulom Germline Variant Module, minimalna pokrivenost po amplikonu potrebna za točno prepoznavanje varijanti iznosi 150x. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utječu na pokrivenost. GC sadržaji i drugi genomske sadržaji mogu utjecati na pokrivenost.
  - Varijacija broja kopija može utjecati na to prepoznaje li se varijanta kao homozigotna ili heterozigotna.
  - Varijante u određenom repetitivnom kontekstu filtriraju se u VCF datotekama. Filtar za ponavljanja RMxN upotrebljava se za filtriranje varijanti ako se cijela sekvenca varijante ili njen dio ponavljaju u referentnom genomu uz položaj varijante. Za prepoznavanje varijanti linija spolnih stanica nužno je barem 9 ponavljanja u referenci da bi se varijanta filtrirala, a pritom se u obzir uzimaju samo ponavljanja duljine do 5 bp (R5x9).
- Ograničenja specifična za somatske varijante:

- Sustav MiSeqDx s modulom Somatic Variant Module namijenjen je za pružanje kvalitativnih rezultata za prepoznavanje somatskih varijanti (npr. prisutnost neke somatske varijante s frekvencijom varijante jednakom ili većom od 0,026 uz ograničenje otkrivanja od 0,05).
- Kad se upotrebljava s modulom Somatic Variant Module, minimalna pokrivenost po ampliconu potrebna za točno prepoznavanje varijante iznosi 450x po oligonukleotidnom skupu. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utječu na pokrivenost. GC sadržaji i drugi genomske sadržaji mogu utjecati na pokrivenost.
- Varijante u određenom repetitivnom kontekstu filtriraju se u VCF datotekama. Filtar za ponavljanja RMxN upotrebljava se za filtriranje varijanti ako se cijela sekvenca varijante ili njen dio ponavljaju u referentnom genomu uz položaj varijante. Pri prepoznavanju somatskih varijanti nužno je barem 6 ponavljanja u referenci da bi se varijanta filtrirala, a pritom se u obzir uzimaju samo ponavljanja duljine do 3 bp (R3x6).
- Modul varijanti u somatskim kromosomima ne razlikuje varijante linija spolnih stanica od somatskih varijanti. Modul je namijenjen za očitavanje varijanti u rasponu frekventnosti varijanti, ali se frekventnost varijanti ne može upotrebljavati za razlikovanje somatskih varijanti od varijanti linija spolnih stanica.
- Normalno tkivo u uzorku utječe na prepoznavanje varijanti. Otkriveno ograničenje prepoznavanja temelji se na frekventnosti varijante u odnosu na ukupni DNK izdvojen iz tumora i normalnog tkiva.

## Komponente proizvoda

Illumina MiSeqDx sastoji se od sljedećeg:

MiSeqDx Instrument (Kataloški broj DX-410-1001)

Za rad instrumenta i analizu podataka obavezne MiSeqDx su sljedeće softverske komponente:

Softverska aplikacija	Funkcija	Opis
MiSeq operativni softver (MOS)	Kontrolira rad instrumenta	Softverska aplikacija MOS upravlja radom instrumenta tijekom sekvenciranja i generira slike koje upotrebljava softver Real-Time Analysis (RTA). Za više informacija pogledajte <i>Referentni priručnik za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 200010452)</i> .
Real-Time Analysis (RTA)	Izvodi primarnu analizu	Softverska aplikacija RTA pretvara slike koje generira MOS za svaki kvadratić u ciklusu obrade sekvenciranjem u datoteke za očitavanje baza koje su ulazni podaci modulima za analizu komponente Local Run Manager. Softverska aplikacija RTA nema korisničko sučelje.
Local Run Manager	Sučelje za odabir modula	Softver Local Run Manager integrirano je rješenje na samom instrumentu za upravljanje korisnicima, izvršavanje sekundarne analize te nadzor statusa. Za više informacija pogledajte <i>Referentni priručnik za softver Local Run Manager v4 za MiSeqDx (broj dokumenta 200046657)</i> .

## Skladištenje i rukovanje

Element	Specifikacija
Temperatura	Transport i skladištenje: -10 °C do 40 °C (14 °F do 104 °F) Radni uvjeti: 19 °C do 25 °C (66 °F do 77 °F)
Vlažnost	Transport i skladištenje: vlaga bez kondenzacije Radni uvjeti: relativna vlažnost 30 – 75 % (bez kondenzacije)

## Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

### Potrošnog materijala

MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloški broj 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (kataloški broj 20063860)

### Potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik

Prije započinjanja obrade provjerite imate li na raspolaganju sljedeći potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik.

Potrošni materijal	Svrha
Alkoholne maramice sa 70 % izopropila ili 70-postotni etanol	Čišćenje stakla i nosača protočnog članka
Laboratorijske maramice koje ne ispuštaju mnogo dlačica	Čišćenje nosača protočnog članka
Papir za objektivne, 4 x 6 inča	Čišćenje protočnog članka
Tween 20	Pranje instrumenta
Pinceta, kvadratnog vrha, plastična (nije obavezno)	Vađenje protočnog članka iz spremnika za transport protočnog članka
Voda, laboratorijske kvalitete	Pranje instrumenta

## Smjernice za vodu laboratorijske kvalitete

Za postupke na instrumentu uvijek upotrebljavajte vodu ili deioniziranu vodu laboratorijske kvalitete. Nipošto nemojte upotrebljavati vodu iz slavine.

Upotrebljavajte samo sljedeće razrede vode ili njihove ekvivalente:

- deionizirana voda
- Illumina PW1
- voda od 18 megaoma (MΩ)
- voda Milli-Q
- voda Super-Q
- voda za primjenu u molekularnoj biologiji

## Upozorenja i mjere opreza



### UPOZORENJE

**Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Ventilacija mora biti prikladna za rukovanje opasnim materijalima u reagensima. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima.** Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (Safety Data Sheets, SDS) na adresi [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

- Svim uzorcima krvi rukujte kao da je poznata njihova inficiranost virusom humane imunodeficijencije (HIV), virusom humanog hepatitisa B (HBV) i drugim patogenim tvarima koje se prenose krvlju (univerzalne mjere opreza).
- Ako se ne slijede navedeni postupci, mogući su pogrešni rezultati ili znatno smanjenje kvalitete uzorka.
- Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Kad rukujete uzorcima i reagensima iz kompleta, koristite se rukavicama za jednokratnu upotrebu i laboratorijskim kutama. Nakon rukovanja uzorcima i reagensima iz kompleta temeljito operite ruke.
- Primijenite odgovarajuće prakse i dobru higijenu u laboratoriju kako biste spriječili kontaminaciju reagensa, instrumenata i genomskih DNK uzoraka PCR proizvodima. Kontaminacija PCR proizvodima može uzrokovati netočne i nepouzdana rezultate.
- Da biste spriječili kontaminaciju, pripazite da se u područjima prije amplifikacije i poslije amplifikacije upotrebljava namjenska oprema i potrošni materijal (npr. pipete, vrhovi pipeta, blokovi za zagrijavanje, vrtložne miješalice i centrifuge).

- Tamo gdje je to prikladno, uparivanje indeksnog uzorka mora točno odgovarati ispisanom rasporedu ploče. Local Run Manager automatski popunjava primere indeksa povezane s nazivima uzoraka kad se unesu u modul. Korisniku se savjetuje da prije pokretanja obrade sekvenciranjem provjeri početnice za indeksiranje povezane s uzorcima. Nepodudaranja između uzorka i rezultata rasporeda na pločici dovode do nemogućnosti pozitivne identifikacije uzorka i netočnih rezultata.
- Preporučuje se instalacija antivirusnog softvera prema odabiru korisnika radi zaštite računala od virusa. Upute za instalaciju potražite u korisničkom priručniku.
- Ne rukujte MiSeqDx kad su s njega uklonjene ploče. Rukovanje instrumentom s uklonjenom bilo kojom pločom predstavlja opasnost od izlaganja naponu električne mreže ili naponu istosmjerne struje.
- Ne dodirujte postolje za protočni članak u odjeljku s protočnim člankom. Grijač u tom odjeljku radi na temperaturi između 22 °C i 95 °C te može uzrokovati opekline.
- Masa instrumenta iznosi oko 57 kg i ako ispadne ili se njime nepažljivo rukuje, može uzrokovati tešku ozljedu.
- Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnom tijelu države članice u kojoj se korisnik i/ili pacijent nalaze.

## Upute za upotrebu

Za sljedeće upute za upotrebu instrumenta MiSeqDx potrebni su reagensi koje sadrži MiSeqDx Reagent Kit v3.

### Izradite obradu pomoću Local Run Manager

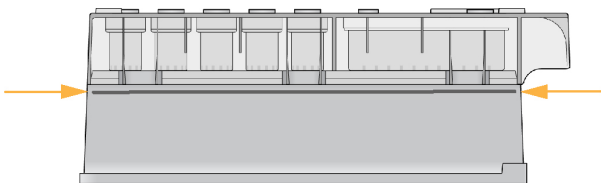
Za detaljne upute o izradi obrade, pogledajte *Referentni priručnik za softver Local Run Manager v4 za MiSeqDx (broj dokumenta 200046657)* i priručnik modula Local Run Manager za modul analize koji koristite.

### Priprema uloška reagensa

U sljedećim se uputama opisuje postupak otapanja reagensa s pomoću vodene kupke sobne temperature.

1. Izvadite spremnik reagensa iz spremišta u kojem je temperatura od –15 °C do –25 °C.
2. Postavite spremnik reagensa u vodenu kupku s dovoljnom količinom deionizirane vode sobne temperature da se postolje spremnika reagensa u nju potopi do crte za maksimalnu količinu vode otisnute na spremniku reagensa. Pazite da voda ne prelazi crtu za maksimalnu količinu vode.

Slika 1 Crtu za maksimalnu količinu vode



3. Pričekajte da se spremnik reagensa otapa u vodenoj kupki sobne temperature otprilike 60 – 90 minuta ili dok se potpuno ne otopi.
4. Izvadite spremnik iz vodene kupke te nježno njime lupkajte po radnoj površini da biste izbacili vodu iz postolja spremnika. Osušite postolje spremnika. Pazite da voda ne poprskava gornji dio spremnika reagensa.

## Provjera spremnika reagensa

1. Deset puta preokrenite spremnik reagensa da biste pomiješali otopljene reagense, a potom provjerite jesu li svi položaji otopljeni.
2. Provjerite jesu li reagensi na položajima 1, 2 i 4 potpuno pomiješani i bez precipitata.

**NAPOMENA** Za pravilno sekvenciranje ključno je da reagensi u spremniku budu potpuno otopljeni i pomiješani.

3. Nježno spremnikom lupkajte po radnoj površini kako biste smanjili broj mjehurića zraka u reagensima.

**NAPOMENA** Na dnu svakog spremnika nalaze se cjevčice za doziranje MiSeqDx koje služe za aspiraciju reagensa, pa je važno da u spremnicima nema mjehurića zraka.

4. Spremnik reagensa držite na ledu ili ga odložite u spremište u kojem je temperatura od 2 °C do 8 °C (do šest sati) dok ne budete spremni za postavljanje obrade. Da biste postigli najbolje rezultate, odmah umetnite uzorak i postavite obradu.

## Priprema uzoraka za sekvenciranje

Upute za pripremu biblioteka uzoraka za sekvenciranje, uključujući za razrjeđivanje biblioteka i stvaranje skupova, potražite u odjeljku Upute za upotrebu u uputama za komplet za pripremu biblioteka.

Razrjeđivanje biblioteka uzoraka ovisi o složenosti oligonukleotidnih skupova. Na instrumentu MiSeqDx potrebna je optimizacija gustoće klastera, a optimalna gustoća klastera ovisi o određenoj analizi za pripremu biblioteka.

## Umetanje biblioteka uzoraka u spremnik

Kad se spremnik reagensa potpuno otopi te bude spreman za upotrebu, u spremnik možete umetnuti uzorke.

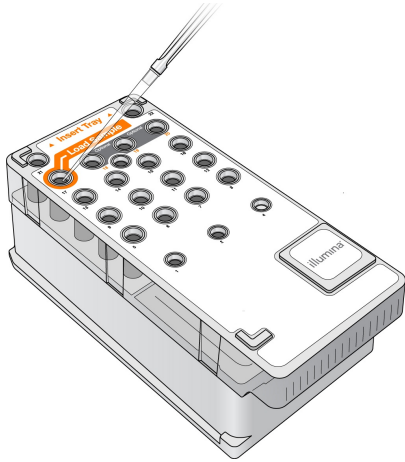
1. Zasebnim, čistim i praznim vrhom pipete od 1 ml probijte zatvarač od folije na bazenu spremnika reagensa označenom **Load Samples** (Umetnite uzorke).

**NAPOMENA** Nemojte probijati nijedan drugi položaj reagensa. Drugi položaji reagensa probit će se automatski tijekom obrade.



2. Pipetom prenesite 600 µl biblioteka uzoraka pripremljene razrijeđene biblioteke amplikona (DAL) u bazen **Load Samples** (Umetnite uzorke). Nemojte dirati zatvarač od folije.
3. Nakon umetanja uzorka provjerite da u bazenu nema mjehurića zraka. Ako ima mjehurića, nježno lupnite spremnikom po radnoj površini da bi mjehurići izašli.

Slika 2 Umetanje biblioteka



4. Prijedite izravno na korake za postavljanje obrade pomoću MiSeq operativni softver (MOS) sučelja.

## Postavljanje obrade

Pogledajte *Referentni priručnik za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 200010452)* za potpune upute za postavljanje obrade.

1. Prijavite se u MiSeqDx lozinkom za softver Local Run Manager.
2. Na početnom zaslonu softvera MOS odaberite **Sequence** (Sekvenciraj).
3. Na popisu odaberite obradu pa **Next** (Dalje).  
Otvorit će se niz zaslona za postavljanje obrade, i to sljedećim redoslijedom: Load Flow Cell (Umetanje protočnog članka), Load Reagents (Umetanje reagensa), Review (Pregled) i Pre-Run check (Provjera prije obrade).
4. Kad se prikaže zaslon Load Flow Cell (Umetanje protočnog članka), očistite i umetnite protočni članak.
5. Zatvorite zasun protočnog članka i vratašca odjeljka za protočni članak.  
I zasun i vratašca odjeljka moraju se zatvoriti prije početka obrade. Kad se umetne protočni članak, softver očitava i bilježi RFID. Potvrda uspješnog očitavanja RFID-a prikazuje se u donjem desnom kutu zaslona.
6. Slijedite upute u softveru za umetanje boce otopine MiSeqDx SBS Solution (PR2), provjeru je li boca za otpad prazna te umetanje spremnika reagensa.  
Kad umetnete bocu otopine MiSeqDx SBS Solution (PR2) i spremnik reagensa, softver očitava i bilježi RFID. Potvrda uspješnog očitavanja RFID-a prikazuje se u donjem desnom kutu zaslona.
7. Kad započne obrada, otvara se zaslon Sequencing (Sekvenciranje). Na tom se zaslonu nalazi vizualni prikaz obrade u tijeku, uključujući intenzitete i rezultate kvalitete (Q-ocjene).

## Rezultati

Real-Time Analysis (RTA) je integrirani softver koji analizira slike, prepoznaje baze i dodjeljuje ocjenu kvalitete svakoj bazi u svakom ciklusu sekvenciranja. Kad završi primarna analiza, modul instrumenta MiSeqDx odabran u postupku Stvaranje obrade pomoću softvera [Izradite obradu pomoću Local Run Manager na stranici 7](#) započinje sekundarnu analizu. Ostale tijekove rada potražite u dokumentaciji za konkretnu analizu.

## Postupci kontrole kvalitete

Softver MiSeqDx uspoređuje svaku obradu, uzorak i očitavanje baza s mjernim podacima za kontrolu kvalitete. Kad je potrebno, valja provjeriti i daju li pozitivne te negativne kontrole iz pripreme biblioteke očekivane rezultate.

## Karakteristike radnih svojstava

Sva su ispitivanja provedena na instrumentu MiSeqDx.

Za pripremu biblioteke za ispitivanja spolnih stanica upotrebljavali su se reagensi MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ili TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. U ta dva kompleta upotrebljavaju se jednaki reagensi za pripremu biblioteka te se razlikuju samo po jednoj stavci tijekom rada: broju ciklusa lančane reakcije polimeraze (PCR) (25 odnosno 28). Dodatni ciklusi PCR-a omogućuju manji unos DNK-a uz TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) u odnosu na MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay (250 ng), što je prikazano u ispitivanju unosa DNK-a uz upotrebu kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteke pripremljene s analizom MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay sekvencirane su s pripadajućim reagensima za sekvenciranje iz kompleta. Biblioteke pripremljene s analizom TruSeq Custom Amplicon Kit Dx sekvencirane su s kompletom MiSeqDx Reagent Kit v3. Ti su reagensi za sekvenciranje povećali izlazne podatke u odnosu na one dobivene uz MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay.

Testiranje obuhvaća raspone prihvata uzoraka koje podržava MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. MiSeqDx podržava 1 – 96 uzoraka po obradi, ovisno o analizi. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro osmišljen je za manje kapacitete prihvata uzoraka u tom rasponu za odabrane analize.

Za somatska ispitivanja upotrebljavao se TruSeq Custom Amplicon Kit Dx uz MiSeqDx Reagent Kit v3.

Za pripremu biblioteka za sekvenciranje praćeni su tijekom rada za spolne stanice odnosno somatske stanice opisani za TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, a analiza je provedena uz pomoć modula Germline Variant Module odnosno Somatic Variant Module, uz dvije iznimke. Za ispitivanja u kojima se upotrebljavao jedan gen (radne karakteristike za spolne stanice; MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay) ili dva gena (radne karakteristike za somatske stanice) kao reprezentativni paneli mutacija upotrebljavali su se tijekom rada i moduli specifični za analizu.

**NAPOMENA** Amplikonski genomski sadržaj sažeto je prikazan u odnosu na sekvencirani genomski lanac. Za amplikone izrađene za minus-lanac sadržaj referentnog genoma jest reverzni komplement (na primjer, područja PolyA na amplikonima minus-lanca odgovaraju područjima PolyT na referentnom genomu).

## Definicije izračuna upotrijebljenih u radnim karakteristikama

- Postotak pozitivnog podudaranja (PPA) izračunava se kao udio lokusa koje je referentna metoda klasificirala kao varijante, a koje analiza točno prijavljuje.
  - (br. lokusa varijanti koje je analiza točno prijavila) / (ukupan br. lokusa varijanti)  
Lokusi varijanti koje prijavi analiza, a u skladu su s referentnom metodom pravi su pozitivni rezultati (TP-ovi). Lokusi varijanti koje analiza prijavljuje kao prepoznavanja referenci ili kao prepoznavanja drugačijih varijanti lažno su negativni rezultati (FN-ovi).
- Postotak negativnog podudaranja (NPA) izračunava se kao udio lokusa koje referentna metoda klasificira kao divlji tip, a koje analiza točno prijavljuje.
  - (br. lokusa divljeg tipa koje je analiza točno prijavila) / (ukupan br. lokusa divljeg tipa)  
Lokusi divljeg tipa koje prijavi analiza, a u skladu su s referentnom metodom pravi su negativni rezultati (TN-ovi). Lokusi divljeg tipa koje analiza prijavljuje kao varijante lažni su pozitivni rezultati (FP-ovi).
- Postotak ukupnog podudaranja (OPA) izračunava se kao udio lokusa koje analiza pravilno prijavi u odnosu na referentnu metodu.
  - ((br. lokusa varijanti koje analiza točno prepoznaje) + (br. lokusa divljeg tipa koje analiza točno prepoznaje)) / ((ukupan br. lokusa varijanti) + (ukupan br. lokusa divljeg tipa))
- Kad se upotrebljavaju za prepoznavanje varijanti, izračuni PPA, NPA i OPA ne obuhvaćaju neprepoznavanja (lokuse varijanti ili referentne lokuse koji ne zadovoljavaju jedan filter kvalitete ili više njih). U dva ispitivanja, neprepoznavanja su uključena u mjerni podatak „% točnih prepoznavanja”, a to je uključivanje neprepoznavanja zabilježeno u primjenjivim tablicama.
- Rezultat prepoznavanja izračunava se kao ukupan broj lokusa koji prolaze filtre podijeljen ukupnim brojem sekvenciranih položaja za kromosome 1–22. Kromosomi X i Y nisu uključeni. Ti mjerni podaci ne uzimaju u obzir slaganje prepoznavanja s referentnom metodom.

Radne karakteristike povezane s predanalitičkim faktorima (npr. metode izdvajanja ili ulazni DNK) pogledajte u uputama za primjenjivu metodu pripreme biblioteke.

## Indeksiranje uzoraka

Primeri za indeksiranje uzorka, koji se dodaju tijekom pripreme biblioteke, dodjeljuju jedinstvenu sekvencu svakom DNK-u uzorka, što omogućuje skupljanje više uzoraka u jednu obradu sekvenciranjem. Indeksiranje uzoraka testirano je za tijekove rada za spolne i somatske stanice.

Ukupno je testirano 96 indeksa uzoraka reprezentativnom analizom namijenjenom za ispitivanje raznih gena koji obuhvaćaju 12 588 baza po lancu na 23 humana kromosoma kako bi se potvrdila sposobnost analize da dosljedno prepozna genotip za dani uzorak u različitim kombinacijama primera za indeksiranje. Kromosom Y ne sadrži pouzdana područja i nije procjenjivan. Testirano je osam jedinstvenih uzoraka s 12 različitih kombinacija primera za indeksiranje po uzorku. Rezultati za uzorak s modula Germline Analysis Module uspoređeni su s verzijom „platinastih genoma“ 2016-01. PPA (za jednonukleotidne varijante i indele) bio je veći od 97 % (točnih pozitivnih prepoznavanja bilo je najmanje 70 za jednonukleotidne varijante, 38 za insercije, 36 za delecije), a NPA bio je 100 % (najmanje 23 440 referentnih položaja po kombinaciji indeksa) za svaku od 96 kombinacija indeksa. Zasebno je testiran jedan indeks da bi se potvrdilo da kemijski sastav reagensa MiSeqDx Reagent Kit v3 za sekvenciranje podržava manje od osam uzoraka (kemijski sastav prethodnog reagensa MiSeqDx Universal Kit 1.0 bio je ograničen na minimalno osam uzoraka). Vrijednosti PPA za jedan indeks bile su 98,9 % (180/182) za jednonukleotidne varijante, 100 % (38/38) za insercije te 100 % (46/46) za delecije. NPA bio je 100 % (23 856/23 856).

Testirano je dvanaest replika (24 biblioteka) uzorka da bi se izmjerila točnost indeksa za somatske varijante učestalosti od 0,05 – 0,10 uz Somatic Variant Module (za somatska prepoznavanja upotrebljavaju se dvije kombinacije indeksa po replici). PPA je bio 100 % za jednonukleotidne varijacije (64/64), insercije (11/11) i delecije (19/19). NPA je bio 100 % (najmanje 11590 referentnih položaja po kombinaciji indeksa) za sve kombinacije indeksa.

## Kontaminacija uzoraka

Tijek rada na instrumentu MiSeqDx obuhvaća pripremu biblioteka i istodobnu obradu za sekvenciranje više uzoraka i kontrole. Ispitivanje kontaminacije uzoraka provedeno je da bi se procijenilo utječu li na rezultate testiranja lažno pozitivni rezultati nastali zbog kontaminacije među jažicama tijekom pripreme biblioteke uzoraka, kao i kontaminacije između dvije uzastopne obrade sekvenciranjem. Upotrijebljene su somatske varijante jer se one mogu otkriti pri nižim učestalostima alela nego varijante spolnih stanica.

Uzorci su se sastojali od četiri uzorka genomskog DNK-a iz staničnih linija, pri čemu je svaki sadržavao različite mutacije panela u reprezentativnoj analizi dva gena. Uzorci su odabrani tako da mutacija na nekom položaju u jednom ima referentnu sekvencu (divlji tip) u drugima.

Kontaminacija među jažicama definirana je kao neuspjeh koji je mogao nastati tijekom ručnih koraka obrade (pipetiranja, miješanja uzoraka itd.). Da bi se procijenila kontaminacija iz jedne jažice uzorka na drugu, provedena su dva testiranja:

- raspored šahovske ploče u kojem se izmjenjuju uzorak genomskog DNK-a (gDNK) visoke razine s mutacijom na genu 1 i uzorak gDNK-a niske razine s mutacijom na genu 2.

- raspored šahovske ploče u kojem se izmjenjuju uzorak gDNK-a visoke razine s mutacijom na genu 2 i uzorak gDNK-a niske razine s mutacijom na genu 1.

Tijekom svake obrade, za lažne pozitivne rezultate (npr. prijavljena mutacija gena 1 u jažici označenoj kao uzorak s mutacijom na genu 2 i obrnuto), procijenjeno je ukupno 12 replika.

Kontaminacija među obradama definira se kao pogreška koja može nastati zbog ostataka iz prethodne obrade sekvenciranjem. Da bi se utvrdilo dolazi li do kontaminacije iz jedne obrade sekvenciranjem na drugu, pripremljene su dvije ploče, od kojih je svaka sadržavala 11 replika jednog jedinstvenog uzorka gDNK-a visoke razine i prazan uzorak, te su sekvencirane jedna za drugom na istom instrumentu MiSeqDx i procijenjene radi utvrđivanja lažno pozitivnih rezultata. Prva je obrada sadržavala 11 replika uzorka s mutacijom na genu 2 i jednu praznu probu. Druga je obrada sadržavala 11 replika uzorka s mutacijom na genu 1 i 1 praznu probu. Najprije je sekvencirana biblioteka uzorka s mutacijom na genu 2, potom je pokrenuta obrada sekvenciranjem za biblioteku uzorka s mutacijom na genu 1, a zatim ponovljena obrada sekvenciranjem biblioteke uzorka s mutacijom na genu 2. Kad bi se u obradi uzorka s mutacijom samo na genu 1 zabilježile bilo kakve mutacije na genu 2 ili obrnuto, to bi se smatralo kontaminacijom.

Prijavljeno je nula lažno pozitivnih rezultata (0/24, 0 %) zbog kontaminacije *među jažicama*. Otkrivene su sve očekivane mutacije. Prijavljeno je nula lažno pozitivnih rezultata (0/24, 0 %) zbog kontaminacije *među obradama*. Otkrivene su sve očekivane mutacije. Prijavljeno je nula lažno pozitivnih rezultata (0/48, 0 %) zbog *ukupne* kontaminacije (kombinirano, među jažicama i među obradama).

## Radne karakteristike za spolne stanice

U ovdje opisanim ispitivanjima za analizu podataka sekvenciranja upotrebljavao se Germline Variant Module, osim za ispitivanja s panelom jednog gena, u kojima se upotrebljavao modul specifičan za analizu.

### Točnost

Sljedeće je ispitivanje provedeno radi procjene točnosti instrumenta MiSeqDx uz MiSeqDx Reagent Kit v3 i DNK visoke kvalitete. U ispitivanju je primijenjena reprezentativna analiza namijenjena za ispitivanje raznih gena koji obuhvaćaju 12 588 baza na 23 različita kromosoma uz upotrebu 150 amplikona. Kromosom Y ne sadrži pouzdana područja i nije procjenjivan. 12 jedinstvenih uzoraka upotrijebljenih u ispitivanju potječu iz jedne obitelji – dvoje roditelja i 10 djece – i često su sekvencirani u više laboratorija te primjenom više metodologija sekvenciranja. Pet je uzoraka od žena, a sedam od muškaraca. Svaki je uzorak testiran u duplikatu. Točnost je utvrđena za jednonukleotidne varijante, insercije i delecije usporedbom podataka iz ispitivanja s referentnom bazom podataka dobro okarakteriziranog kompozita. Sekvenca referentne baze podataka („platinasti genom” verzije 2016-01) izvedena je iz kombinacije više metodologija sekvenciranja, javno dostupnih podataka i nasljednih podataka. Definirana su pouzdana područja genoma na temelju te referentne metode, osim u slučajevima kad je navedeno drugačije. Uzorci su ukupno obrađeni osam puta, a tablice prikazane u nastavku radi predstavljanja točnosti utemeljene su na podacima iz prve obrade.

Tablica 1 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene uz postotak pozitivnog i negativnog podudaranja prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita za PPA izračune. Tri su vrste varijanti (SNVs, insercije i brisanja) kombinirane. Budući da referentna metoda nudi samo rezultate za jednonukleotidne varijante i insercije/brisanja, rezultati s bazama bez varijanti uspoređuju se s međuverzijom referentne sekvence humanog genoma hg19 radi NPA izračuna.

Tablica 1 Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx po uzorku

Uzorak	Srednja uspješnost prepoznavanja	Ukupan broj varijanti	Ukupan broj TP varijanti	Ukupan broj FN varijanti	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupan broj TN prepoznavanja	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

Uzorak	Srednja uspješnost prepoznavanja	Ukupan broj varijanti	Ukupan broj TP varijanti	Ukupan broj FN varijanti	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupan broj TN prepoznavanja	PPA	NPA	OPA
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24 052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23 862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23 962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23 870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23 942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23 942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23 888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24 002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23 810	100	100	100

Reprezentativna analiza sastojala se od 150 amplikona čija je namjena pokrivanje raznih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona bio je u rasponu 26 – 87 %. Amplikoni su bili u rasponu jednonukleotidnih (npr. Poly A, Poly T), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. Prikupljeni su podaci za svaki amplikon (Tablica 2) da bi se utvrdio učinak genomskog sadržaja na % točnih prepoznavanja. % točnih prepoznavanja sastoji se od prepoznavanja varijanti i referenci te je manji od 100 % ako postoje netočna prepoznavanja ili neprepoznavanja. Do neprepoznavanja dolazi kad nije zadovoljen jedan filter ili više njih za prepoznavanje varijante (npr. nedovoljna pokrivenost).

Od osam FN varijanti iz Tablica 2 sedam je bilo s insercijom 1 bp na amplikonu 111, koji sadrži i homopolimer PolyA te sadržaj GC-a 0,29. Preostali 1 FN (netočno prepoznavanje) bio je zbog očekivane heterozigotne jednonukleotidne varijante na amplikonu 125 sadržaja GCa 0,68, koja je prepoznata kao homozigotna varijanta. Učestalost jednonukleotidnih varijanti bila je 0,71, što je iznad praga od 0,70 za klasifikaciju kao homozigotne varijante. Amplikon s najmanjim % točnih prepoznavanja (98,2 %) bio je amplikon 17 s 40 neprepoznavanja te s AT ponavljanjima i 27 % sadržaja GC-a.

Tablica 2 Točnost na razini amplikona za instrument MiSeqDx

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nije primjenjivo	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Nije primjenjivo	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primjenjivo	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nije primjenjivo	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100



Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nije primjenjivo	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nije primjenjivo	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nije primjenjivo	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	2113	0	23	98,9

Amplikon Kromosom		Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nije primjenjivo	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primjenjivo	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primjenjivo	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primjenjivo	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primjenjivo	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nije primjenjivo	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nije primjenjivo	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	2016.	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nije primjenjivo	0,49	1944	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Nije primjenjivo	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primjenjivo	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nije primjenjivo	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primjenjivo	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT (3), AT (4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primjenjivo	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nije primjenjivo	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nije primjenjivo	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primjenjivo	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primjenjivo	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nije primjenjivo	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyA (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primjenjivo	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nije primjenjivo	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nije primjenjivo	0,52	1704	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	Nije primjenjivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	Nije primjenjivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nije primjenjivo

Varijante koje nisu prepoznate prikazane su sažeto u [Tablica 3](#). Konkretni filtri koji su uzrokovali neprepoznavanja navedeni su u tablici. Insercija na amplikonu 111 filtrirana je za devet od 16 pojava, a preostalih sedam pojava prepoznato je kao reference, stoga su FN-ovi.

Tablica 3 Sažetak neprepoznavanja varijanti

Broj amplikona	Krom.:položaj	Varijanta	Sadržaj odgovarajućeg amplikona	Filtar	Propuštene varijante	Očekivane varijante	FN prepoznavanja
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Ponovljeni filtar. Varijanta se filtrira ako je cijela varijanta ili njezin dio ponovljeno prisutan u referentnom genomu uz položaj te varijante. Nužno je najmanje devet ponavljanja u referenci, a u obzir se uzimaju samo ponavljanja duljine do 5 bp.

Rezultati sekvenciranja za uzorak NA12878 uspoređeni su s visokopouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za norme i tehnologije (NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona njih 92 bilo je posve sadržano u visokopouzdanim genomskim područjima, za 41 amplikon bilo je djelomičnih preklapanja, a za 17 amplikona nije bilo preklapanja s NIST-ovom sekvencom. To je dalo 10 000 koordinata po replici za usporedbu. Prepoznavanja baza izvan varijanti uspoređena su s referentnom sekvencom humanog genoma 19. Rezultati točnosti prikazani su u [Tablica 4](#).

Tablica 4 Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx za uzorak NA12878 s bazom podataka NIST-a

Uzorak	Broj amplikona	Srednja uspješnost prepoznavanja	Ukupan broj TP varijanti	Ukupan broj FN varijanti	Ukupan broj TN prepoznavanja	Ukupan broj FP prepoznavanja	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Uzorci su dodatno analizirani radi prepoznavanja malih insercija i delecija (indela) ([Tablica 5](#)). U nekim su slučajevima dva uzorka ili više njih sadržavali zajednički indel, što je naznačeno u stupcu Ukupan broj replika uzorka s indelom. Rezultati obje replike 12 valjanih uzoraka uključeni su u [Tablica 5](#). Ukupno je bio 71 indel u rasponu veličina 1 – 24 bp za insercije odnosno 1 – 25 bp za delecije. Otkriveno je 69 indela za svaki uz postotak pozitivnog podudaranja 100 %. Za jednu deleciju (amplikon 64; delecija 2 bp (krom. 10 55892600 TAC>T) nije bilo točnih prepoznavanja jer je svaka od varijanti bila neprepoznavanje zbog filtra R5x9. Stoga se PPA, za koji se isključuju neprepoznavanja, nije mogao izračunati. I za drugi indel, insercija 1 bp (krom. 17 39589692 C>CA na amplikonu 111), nije bilo točnih prepoznavanja jer je devet varijanti bilo neprepoznavanje zbog filtra R5x9, a sedam su bila FN prepoznavanja.

Tablica 5 Sažetak otkrivanja indela instrumentom MiSeqDx

Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
1	1	36450544	93	Delecija 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	Delecija 3 bp	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	Insercija 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	Delecija 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	Insercija 5 bp	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	Insercija 3 bp	C>CATG	10	0	0	10	100
8	2	55862804	90	Insercija 7 bp	T>TTTGTTAA	14	0	0	14	100

Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
9	2	87003972	80	Delecija 6 bp	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	Insercija 5 bp	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	Insercija 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	Insercija 2 bp	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	Delecija 23 bp	TAACTTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	Insercija 9 bp	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	Delecija 1 bp	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	Delecija 8 bp	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	Insercija 11 bp	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	Delecija 4 bp	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	Insercija 8 bp	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	Delecija 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	Delecija 3 bp	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	Delecija 25 bp	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	Delecija 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	Insercija 1 bp	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	Delecija 4 bp	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	Insercija 1 bp	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	Delecija 4 bp	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	Delecija 11 bp	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	Delecija 1 bp	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	Insercija 4 bp	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	Insercija 4 bp	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	Delecija 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	Delecija 3 bp	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	Delecija 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	Delecija 2 bp	TAC>T	10	10	0	0	Nije primjenjivo

Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
68	11	30177690	70	Insercija 2 bp	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	Insercija 8 bp	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	Delecija 8 bp	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	Delecija 2 bp	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	Insercija 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	Insercija 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	Insercija 4 bp	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	Delecija 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	Delecija 22 bp	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	Insercija 4 bp	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	Delecija 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	Delecija 5 bp	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	Delecija 6 bp	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	Delecija 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	Insercija 3 bp	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	Insercija 4 bp	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	Delecija 7 bp	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	Delecija 1 bp	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	Insercija 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	Insercija 4 bp	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	Insercija 1 bp	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	Insercija 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	Delecija 4 bp	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	Delecija 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	Insercija 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	Insercija 3 bp	T>TGAG	20	0	0	20	100



Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
122	18	54815706	85	Delecija 2 bp	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	Delecija 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100
131	20	25278464	101	Insercija 5 bp	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	Insercija 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	Delecija 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	Insercija 11 bp	G>GATAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	Delecija 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	Delecija 5 bp	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	Insercija 6 bp	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	Insercija 5 bp	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	Delecija 10 bp	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Ponovljivost

Provedena su dva ispitivanja radi procjene ponovljivosti instrumenta MiSeqDx s linijama stanica (1. ispitivanje i 2. ispitivanje) ili krvlju bez leukocita s dodanim linijama stanica (2. ispitivanje). U 1. ispitivanju upotrebljavano je više instrumenata. U 2. ispitivanju sudjelovalo je više centara.

### 1. ispitivanje

Ponovljivost instrumenta MiSeqDx utvrđena je na dva instrumenta s dva rukovatelja i dvije serije reagensa u ukupno osam obrada. Reprezentativna analiza, uzorci i referentna metoda isti su kao što je opisano za ispitivanje točnosti.

Rezultati su predstavljeni za svaki amplikon za svaki instrument ([Tablica 6](#)) da bi se dokazala ponovljivost prepoznavanja na različitim instrumentima. Postotak točnih prepoznavanja obuhvaćao je i netočna prepoznavanja i neprepoznavanja (nije zadovoljen jedan filtar ili više njih za prepoznavanje varijante). Instrumenti su generirali slične brojeve neprepoznavanja i netočnih prepoznavanja ovisnih o određenom amplikonu.

Tablica 6 Rezultati ispitivanja ponovljivosti na različitim instrumentima MiSeqDx (na razini ampikona)

Amplikon	Kromosom	Početak ampikona	Kraj ampikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Nije primjenjivo	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Nije primjenjivo	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	8761	0	167	8760	0	168

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primjenjivo	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Nije primjenjivo	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Nije primjenjivo	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Nije primjenjivo	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG (3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Nije primjenjivo	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	8550	0	90	8550	0	90
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Nije primjenjivo	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Nije primjenjivo	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	8452	0	92	8449	0	95

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Nije primjenjivo	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primjenjivo	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primjenjivo	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primjenjivo	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primjenjivo	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Nije primjenjivo	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
73	11	101347052	101347136	85	85	Nije primjenjivo	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Nije primjenjivo	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Nije primjenjivo	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primjenjivo	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Nije primjenjivo	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primjenjivo	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), indel	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primjenjivo	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Nije primjenjivo	0,48	6240	0	0	6240	0	0
124	19	625143	625241	99	99	Nije primjenjivo	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primjenjivo	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primjenjivo	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Nije primjenjivo	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG (4), indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0



Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1				MiSeqDx 2	
								Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyA (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primjenjivo	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Nije primjenjivo	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Nije primjenjivo	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Rezultati ispitivanja ponovljivosti analizirani su za svakog rukovatelja zasebno putem učestalosti varijanti [Tablica 7](#). Analizom se utvrdilo da su učestalosti varijante za sve rukovatelje bile dosljedne. Predstavljene su srednje učestalosti varijanti uz standardnu devijaciju +/- 1.

Tablica 7 Rezultati za instrument MiSeqDx za svakog rukovatelja zasebno

Raspon učestalosti varijanti	Broj jedinstvenih varijanti	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 1	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 2	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 1	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 2
Homozigotne (0,70 – 1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Heterozigotne (0,20 – 0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Rezultati ispitivanja ponovljivosti za svaki uzorak prikazani su zajedno za svih osam obrada [Tablica 8](#). Prepoznavanje se procjenjuje za svaku vrstu varijante zasebno – SNV, umetanja i brisanja. Referentni se položaji ne računaju. Tom se analizom pokazalo da su rezultati za varijante ponovljivi na više uzoraka.

Tablica 8 Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx po uzorku

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

Podaci dobiveni iz osam obrada tijekom ispitivanja ponovljivosti podržavaju tvrdnju da instrument MiSeqDx može dosljedno sekvencirati:

- sadržaj GC-a  $\geq 19\%$  (sve su prepoznate baze u 192 od 192 sekvencirana amplicona s 19 % sadržaja GC-a prepoznate točno uz stopu neprepoznavanja od 1,1 %)
- sadržaj GC-a  $\leq 78\%$  (sve su prepoznate baze u 192 od 192 sekvencirana amplicona sa 78 % sadržaja GC-a prepoznate točno uz nula neprepoznavanja)
- duljine PolyA  $\leq 8$  (ponavljanje PolyA od 8 nukleotida točno je prepoznato u 192 od 192 sekvencirana amplicona koji sadrže PolyA = 8)
- duljine PolyT  $\leq 10$  (ponavljanje PolyT od 10 nukleotida točno je prepoznato u 192 od 192 sekvencirana amplicona koji sadrže PolyT = 10)
- duljine PolyG  $\leq 7$  (ponavljanje PolyG od 7 nukleotida točno je prepoznato u 192 od 192 sekvencirana amplicona koji sadrže PolyG = 7)
- duljine PolyC  $\leq 6$  (ponavljanje PolyC od 6 nukleotida točno je prepoznato u 576 od 576 sekvenciranih amplicona koji sadrže PolyC = 6)
- duljine dinukleotidnih ponavljanja  $\leq 11x$  (sve su prepoznate baze u 192 od 192 sekvencirana amplicona koji sadrže 11x ponavljanje dinukleotida točno prepoznate uz stopu neprepoznavanja od 0,5 %)
- duljine trinukleotidnih ponavljanja  $\leq 5x$  (sve su prepoznate baze u 192 od 192 sekvencirana amplicona koji sadrže 5x ponavljanje trinukleotida točno prepoznate uz stopu neprepoznavanja od 0,5 %)
- 24 ili manje insercija baza te 25 ili manje delecija baza
  - 24-bazne insercije točno su prepoznate u 192 od 192 uzorka
  - 25-bazne delecije točno su prepoznate u 223 uzorka te pogrešno prepoznate u 1 od 224 uzorka

## 2. ispitivanje

Ispitivanje ponovljivosti na različitim lokacijama, koje je provedeno uz pomoć reprezentativne analize Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Assay, obuhvaćalo je podskup klinički značajnih genetskih varijacija za *CFTR* analiziran softverom MiSeq Reporter uz pomoć tijeka rada za ciljano sekvenciranje DNK-a platforme MiSeqDx. Slijepo ispitivanje obuhvaćalo je 3 ispitne lokacije s 2 rukovatelja na svakoj lokaciji. Svaki rukovatelj na svakoj lokaciji testirao je dva panela dobro okarakteriziranog kompozita, svaki za 46 uzoraka, uz ukupno 810 prepoznavanja po lokaciji. Paneli su sadržavali mješavinu genomskog DNK-a i staničnih linija s poznatim varijantama na genu za *CFTR*, kao i krv bez leukocita u koju su dodane stanične linije s poznatim varijantama na genu za *CFTR*. Upotrebljavali su se i

uzorci krvi kako bi se uključili koraci izdvajanja koji se upotrebljavaju za pripremu gDNK-a kao primarnog ulaza za tijek rada analize. Stopa prolaznosti uzorka, koja se definira kao broj uzoraka koji zadovolje mjerne podatke za kontrolu kvalitete pri prvom pokušaju, bila je 99,88 %. Svi rezultati testiranja odnose se na početno testiranje.

Tablica 9 Sažetak rezultata ispitivanja ponovljivosti provedenog s reprezentativnom analizom MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Ploča	Broj uzorka	Genotip uzorka	Varijante	Ukupno prepoznavanja po lokaciji	Podudarna pozitivna prepoznavanja (varijante)			Podudarna negativna prepoznavanja (divlji tip)			Broj pogrešnih prepoznavanja	Broj neprepoznavanja	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nisu prisutne	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100

Ploča	Broj uzorka	Genotip uzorka	Varijante	Ukupno prepoznavanja po lokaciji	Podudarna pozitivna prepoznavanja (varijante)			Podudarna negativna prepoznavanja (divlji tip)			Broj pogrešnih prepoznavanja	Broj neprepoznavanja	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija					
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	Nije primjenjivo	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	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

Ploča	Broj uzorka	Genotip uzorka	Varijante	Ukupno prepoznavanja po lokaciji	Podudarna pozitivna prepoznavanja (varijante)			Podudarna negativna prepoznavanja (divlji tip)			Broj pogrešnih prepoznavanja	Broj neprepoznavanja	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija					
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	100	100

Ploča	Broj uzorka	Genotip uzorka	Varijante	Ukupno prepoznavanja po lokaciji	Podudarna pozitivna prepoznavanja (varijante)			Podudarna negativna prepoznavanja (divlji tip)			Broj pogrešnih prepoznavanja	Broj neprepoznavanja	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija					
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	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	100	100

Ploča	Broj uzorka	Genotip uzorka	Varijante	Ukupno prepoznavanja po lokaciji	Podudarna pozitivna prepoznavanja (varijante)			Podudarna negativna prepoznavanja (divlji tip)			Broj pogrešnih prepoznavanja	Broj neprepoznavanja	Pozitivno podudaranje (%)	Negativno podudaranje (%)	Ukupno podudaranje (%)
					1.	2.	3.	1.	2.	3.					
					lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija	lokacija					
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Nije primjenjivo	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
Ukupno				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Lokacija divljeg tipa koja odgovara varijanti N1303K za jednu repliku rezultirala je neprepoznavanjem zbog nedovoljnog pokrivanja.

<sup>2</sup> Jedna replika uzoraka 5 i 75 imala je stopu prepoznavanja 0 %. Dodatnim istraživanjem otkriveno je da uzorci možda nisu bili dodani na ploču uzorka prije pripreme biblioteke jer su preostali volumeni uzoraka u epruvetama upućivali na to da nije uklonjeno nimalo volumena.

<sup>3</sup> Dokazi upućuju na to da je rukovatelj prije pripreme biblioteke vjerojatno zamijenio uzorke 9 i 10.

<sup>4</sup> Lokacija divljeg tipa koja odgovara varijanti M1V za jednu repliku iz oba uzorka rezultirala je neprepoznavanjem zbog nedovoljnog pokrivanja.

## Radne karakteristike za somatske stanice

U ovdje opisanim ispitivanjima za analizu podataka sekvenciranja upotrebljavao se Somatic Variant Module, osim za ispitivanja s panelom dva gena, u kojima se upotrebljavao modul specifičan za analizu.



## Točnost

Provedena su tri ispitivanja radi procjene točnosti instrumenta MiSeqDx s DNK-om izdvojenim iz FFPE uzoraka.

### 1. ispitivanje

U ispitivanju je primijenjena reprezentativna analiza namijenjena za ispitivanje raznih gena koji obuhvaćaju 12 588 baza na 23 različita kromosoma uz upotrebu 150 amplikona. Kromosom Y ne sadrži pouzdana područja i nije procjenjivan. Pet jedinstvenih uzoraka upotrijebljenih u ispitivanju potjecali su iz jedne obitelji – dvoje roditelja i troje djece – i često su sekvencirani u više laboratorija te primjenom više metodologija sekvenciranja. Tri su uzorka od žena, a dva od muškaraca. Svi su uzorci bili fiksirani u formalinu i uklopljeni u parafinu prije izdvajanja DNK-a za ispitivanje. Uzorak GM12877 bio je razrijeđen na razini DNK-a uzorkom GM12878 da bi se dobio GM12877-D radi izrade skupa varijanti učestalosti blizu 5 % i 10 %. Testiranje svakog uzorka duplicirano je, osim GM12877-D, koji je testiran u pet replika. Točnost je utvrđena za jednonukleotidne varijante, insercije i delecije usporedbom podataka iz ispitivanja s referentnom bazom podataka dobro okarakteriziranog kompozita. Sekvenca referentne baze podataka („platinasti genom” verzije 2016-01) izvedena je iz kombinacije više metodologija sekvenciranja, javno dostupnih podataka i nasljednih podataka. Definirana su pouzdana područja genoma na temelju te referentne metode, osim u slučajevima kad je navedeno drugačije. Uzorci su ukupno obrađeni osam puta. Tablice prikazane u nastavku radi predstavljanja točnosti utemeljene su na podacima iz prve obrade.

Tablica 10 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene uz postotak pozitivnog i negativnog podudaranja prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita za PPA izračune. Tri su vrste varijanti (SNVs, insercije i brisanja) kombinirane. Budući da referentna metoda nudi samo rezultate za jednonukleotidne varijante i insercije/brisanja, rezultati s bazama bez varijanti uspoređuju se s međuverzijom referentne sekvence humanog genoma hg19 radi NPA izračuna.

Tablica 10 Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx s referentnim podacima za 6 uzoraka dobro okarakteriziranog kompozita

Uzorak	Srednja uspješnost prepoznavanja	Ukupan broj varijanti	Ukupan broj TP varijanti	Ukupan broj FN varijanti	Ukupan broj TN prepoznavanja	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23 719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23 482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23 744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23 713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23 652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>	98,4	155	155	0	57 608	100	100	100

<sup>1</sup> Varijante s učestalošću većom od 20 %.

<sup>2</sup> Varijanta s učestalošću manjom od 20 %.

Izrađeno je 150 amplikona radi pokrivanja različitih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona bio je u rasponu 26 – 87 %. Amplikoni su imali i niz jednonukleotidnih (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. U analizi je upotrebjeno 6 jedinstvenih uzoraka. Prikupljeni su podaci za svaki amplikon (Tablica 11) da bi se utvrdio učinak genomskog sadržaja na % točnih prepoznavanja. % točnih prepoznavanja sastoji se od prepoznavanja varijanti i referenci te je manji od 100 % ako postoje netočna prepoznavanja ili neprepoznavanja. Do neprepoznavanja dolazi kad nije zadovoljen jedan filter ili više njih za prepoznavanje varijante (npr. nedovoljna pokrivenost). Nije bilo netočnih prepoznavanja. Broj neprepoznavanja znatno se razlikovao od amplikona do amplikona. Sadržaj GC-a i nekoliko interakcija sa sadržajem GC-a bili su najvažniji prediktori neprepoznavanja. 2040/2580 (79 %) neprepoznavanja bilo je zbog nezadovoljavanja specifikacija pokrivača. Među amplikonima sa sadržajem GC-a većim od 78 % bilo je najviše neprepoznavanja. Za reprezentativni amplikon sa 78 % sadržaja GC-a bilo je ukupno 675 neprepoznavanja. Za reprezentativni amplikon s 87 % bilo je ukupno 1365 neprepoznavanja. Pokrivenost se može povećati smanjivanjem broja uzoraka koji se umeću u protočni članak, čime se može omogućiti otkrivanje na amplikonima s visokim sadržajem GC-a.

Tablica 11 Podaci o točnosti na razini amplikona

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), indel	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nije primjenjivo	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), indel	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	1365	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
15	2	228147052	228147144	93	93	Nije primjenjivo	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), indel	0,42	1095	0	0	100
17	3	44662229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primjenjivo	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nije primjenjivo	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), indel	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), indel	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), indel	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), indel	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
43	7	22202076	22202148	73	73	Nije primjenjivo	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), indel	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nije primjenjivo	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nije primjenjivo	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Nije primjenjivo	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), indel	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), indel	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primjenjivo	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primjenjivo	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primjenjivo	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primjenjivo	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
71	11	64418856	64418957	102	102	Nije primjenjivo	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Nije primjenjivo	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), indel	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), indel	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nije primjenjivo	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100
83	12	24167504	24167576	73	73	Nije primjenjivo	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primjenjivo	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), indel	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), indel	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
99	15	89817413	89817503	91	91	Nije primjenjivo	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primjenjivo	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), indel	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), indel (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
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	Nije primjenjivo	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), indel	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nije primjenjivo	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nije primjenjivo	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primjenjivo	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primjenjivo	0,64	1050	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Ukupan broj točnih prepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	% točnih očitavanja
127	20	746056	746149	94	94	Nije primjenjivo	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	1029	0	7	99,3
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyA (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primjenjivo	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nije primjenjivo	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nije primjenjivo	0,52	1065	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	Nije primjenjivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	Nije primjenjivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Nije primjenjivo

Varijante koje nisu prepoznate prikazane su sažeto u [Tablica 12](#). Konkretni filtri koji su uzrokovali neprepoznavanja navedeni su u tablici.

**Tablica 12** Sažetak neprepoznavanja varijanti

Broj amplikona	Krom.: položaj	Varijanta	Sadržaj odgovarajućeg amplikona	Filtar	Propuštene varijante	Očekivane varijante
28	5:1882129	T > G	78 % GC	LowDP <sup>1</sup>	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61 % GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87 % GC	LowDP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42 % GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29 % GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP: Niska pokrivenost. Varijanta se filtrira ako je dubina u najmanje jednom skupu na tom položaju manja od 900.

<sup>2</sup> R3x6: Ponovljeni filtar. Varijanta se filtrira ako je cijela varijanta ili njezin dio ponovljeno prisutan u referentnom genomu uz položaj te varijante. Nužno je najmanje šest ponavljanja u referenci, a u obzir se uzimaju samo ponavljanja duljine do 3 bp.

Rezultati sekvenciranja za uzorak uspoređeni su s visokopouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za norme i tehnologije (National Institute of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona njih 92 bilo je posve sadržano u visokopouzdanim genomskim područjima, za 41 amplikon bilo je djelomičnih preklapanja, a za 17 amplikona nije bilo preklapanja s NIST-ovom sekvencom. To je dalo 10 000 koordinata po replici za usporedbu. Očitavanja baza izvan varijanti uspoređena su s međuverzijom referentne sekvence humanog genoma hg19. Rezultati točnosti prikazani su u [Tablica 13](#).

**Tablica 13** Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx s referencom NIST-a za uzorak GM12878

Uzorak	Broj amplikona	Srednja uspješnost prepoznavanja	Ukupan broj TP prepoznavanja varijanti	Ukupan broj FN prepoznavanja varijanti	Ukupan broj TN prepoznavanja	Ukupan broj FP prepoznavanja	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Pet nerazrijeđenih uzoraka dodatno je analizirano radi prepoznavanja malih insercija i delecija (indel) ([Tablica 14](#)). U nekim su slučajevima dva uzorka ili više njih sadržavali zajednički indel, što je naznačeno u stupcu Ukupan broj replika uzorka s indelom. Rezultati obje replike tih pet uzoraka uključeni su u [Tablica 14](#). Ukupno je bio 71 indel u rasponu veličina 1 – 24 bp za insercije odnosno 1 – 25 bp za delecije. Otkriveno je 68 indela za svaki uz postotak pozitivnog podudaranja od 1. Za tri insercije i delecije nije bilo točnih prepoznavanja jer je svaka od tih varijanti bila neprepoznavanje zbog filtra R3x6. Stoga se PPA, za koji se isključuju neprepoznavanja, nije mogao izračunati. Tri su varijante bile delecija 1 bp (krom. 8 24811064 AG>A); delecija 2 bp (krom. 10 55892600 TAC>T) i insercija 1 bp (krom. 17 39589692 C>CA).



Tablica 14 Sažetak otkrivanja indela instrumentom MiSeqDx

Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
1	1	36450544	93	Delecija 25 bp	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	Delecija 3 bp	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	Insercija 23 bp	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	Delecija 17 bp	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	Insercija 5 bp	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	Insercija 3 bp	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	Insercija 7 bp	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	Delecija 6 bp	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	Insercija 5 bp	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	Insercija 12 bp	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	Insercija 2 bp	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	Delecija 23 bp	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	Insercija 9 bp	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	Delecija 1 bp	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	Delecija 8 bp	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100
27	4	164446785	62	Insercija 11 bp	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	Delecija 4 bp	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	Insercija 8 bp	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	Delecija 21 bp	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	Delecija 3 bp	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	Delecija 25 bp	CTTTCACTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	Delecija 23 bp	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	Insercija 1 bp	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	Delecija 4 bp	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	Insercija 1 bp	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	Delecija 4 bp	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	Delecija 11 bp	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100

Amplikon Kromosom		Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
52	8	24811064	90	Delecija 1 bp	AG>A	15	15	0	0	Nije primjenjivo
53	8	76518677	67	Insercija 4 bp	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	Insercija 4 bp	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	Delecija 21 bp	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	Delecija 3 bp	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	Delecija 16 bp	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	Delecija 2 bp	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	Insercija 2 bp	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	Insercija 8 bp	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	Delecija 8 bp	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	Delecija 2 bp	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	Insercija 21 bp	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	Insercija 19 bp	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	Insercija 4 bp	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	Delecija 20 bp	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	Delecija 22 bp	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100
90	14	58050081	81	Insercija 4 bp	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	Delecija 16 bp	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	Delecija 5 bp	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	Delecija 6 bp	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	Delecija 25 bp	GCCCCTGAGCCAGCCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	Insercija 3 bp	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	Insercija 4 bp	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	Delecija 7 bp	ATTATTTTC>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	Delecija 1 bp	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	Insercija 18 bp	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	Insercija 4 bp	A>AACAC	7	0	0	7	100

Amplikon	Kromosom	Položaj	Veličina analiziranog fragmenta	Vrsta i duljina indela amplikona	Indel	Ukupan broj replika uzorka s indelom	Broj neprepoznavanja	Ukupan broj netočnih prepoznavanja indela	Ukupan broj točnih prepoznavanja indela	PPA
111	17	39589692	84	Insercija 1 bp	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	Insercija 24 bp	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	Delecija 4 bp	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	Delecija 12 bp	TTTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	Insercija 22 bp	T>TGTATCTTAGCAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	Insercija 3 bp	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	Delecija 2 bp	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	Delecija 15 bp	TACTTGAGAACTGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	Insercija 5 bp	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	Insercija 11 bp	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	Delecija 16 bp	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	Insercija 11 bp	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	Delecija 21 bp	ACTCAAGATAACTCATGTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	Delecija 5 bp	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	Insercija 6 bp	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	Insercija 5 bp	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	Delecija 10 bp	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## 2. ispitivanje

U tom su se ispitivanju upotrebljavali FFPE uzorci tkiva kolorektalnog karcinoma iz banke uzoraka te reprezentativna analiza dva gena, koja je uspoređena s referentnom metodom, dvosmjernim Sangerovim sekvenciranjem (Sanger). Od ukupno 1183 ispitanika njih 441 imalo je valjani rezultat Sangerove metode i reprezentativne analize. Pri procjeni na razini ispitanika ([Tablica 15](#)), 230 od 441 ispitanika bilo je pozitivno prema Sangerovoj metodi (mutacija otkrivena Sangerovom metodom). Njih 227 bilo je pozitivno prema reprezentativnoj analizi. Preostalih 211 od 441 ispitanika bilo je negativno prema Sangerovoj metodi (nije otkrivena mutacija Sangerovom metodom). Njih 206 bilo je negativno prema reprezentativnoj analizi. Rezultat je bio postotak pozitivnog podudaranja (eng. Positive Percent Agreement, PPA) od 98,7 % te postotak negativnog podudaranja (eng. Negative Percent Agreement, NPA) od 97,6 % ([Tablica 15](#)).

Tablica 15 Postotak pozitivnog i negativnog podudaranja rezultata na razini ispitanika

Reprezentativna analiza	Sangerova metoda		Ukupno
	Pozitivan	Negativan	
Pozitivan	227 <sup>1</sup>	5	232
Negativan	3 <sup>2</sup>	206	209
Ukupno	230	211	441

Radne karakteristike Sažetak		
Podudaranje Statistički podaci	Procjena jednim brojem	Točno 95-postotni interval pouzdanosti
PPA	227/230 = 98,7 %	[96,2 %, 99,7 %]
NPA	206/211 = 97,6 %	[94,6 %, 99,2 %]

<sup>1</sup>Za rezultate na razini jednog ispitanika za sve mutacije bilo je 224 točnih podudaranja. Za dva ispitanika MiSeqDx otkrio je mutaciju otkrivenu Sangerovom metodom i jednu dodatnu mutaciju. Za jednog ispitanika instrumentom MiSeqDx i Sangerovom metodom otkrivene su različite mutacije.

<sup>2</sup>Jedan je ispitanik imao dvije mutacije otkrivene Sangerovom metodom. Dva ispitanika imala su jednu mutaciju otkrivenu Sangerovom metodom.

### 3. ispitivanje

U ispitivanju su procjenjivane biblioteke DNK-a pripremljene uz pomoć FFPE uzoraka više vrsta tkiva. Procijenjeno je ukupno 109 FFPE uzoraka osam različitih tkiva (crijeva, jajnika, gušterače, nadbubrežne žlijezde, mjehura, jetre, štitnjače i dojke), pri čemu je svaku vrstu tkiva predstavljalo najmanje 11 FFPE uzoraka. Tkivo nadbubrežne žlijezde sadržavalo je metastaze tumora jednjaka, pluća, debelog crijeva. Ostalo tkivo sadržavalo je primarne tumore. U tom je ispitivanju primijenjena reprezentativna analiza namijenjena za ispitivanje 26 gena koji obuhvaćaju 21 577 baza na 17 različitih kromosoma. Sangerovim sekvenciranjem sekvencirano je šest različitih gena (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* i *BRAF*), pri čemu je za svaki tumor Sangerovim sekvenciranjem sekvencirano 1 – 3 gena na temelju očekivane pojavnosti somatskih mutacija za taj tumor. U rezultatima Sangerova sekvenciranja prepoznato je 39 somatskih mutacija jednonukleotidnih varijanti u 33 od 109 FFPE uzoraka. MiSeqDx je prepoznao 36 somatskih mutacija jednonukleotidnih varijanti u 32 od 109 FFPE uzoraka uz jedan lažno negativan rezultat i dva neprepoznavanja položaja varijante. PPA je bio 97,3 %. U svih 109 FFPE uzoraka MiSeqDx je prepoznao 78 975 referentnih baza uz 29 lažno pozitivnih rezultata u odnosu na Sangerovo sekvenciranje i 3416 neprepoznavanja. NPA je bio 99,9 %. Između dviju metoda delecija dviju baza bila je podudarna. [Tablica 16](#) prikazuje sažetak rezultata po vrsti tkiva.

Tablica 16 Postotak pozitivnog i negativnog podudaranja prema vrsti tkiva

Vrsta tkiva	Broj uzoraka	Ukupan broj varijanti	Ukupan broj TP varijanti	Ukupan broj FN varijanti	Ukupan broj TN prepoznavanja	Ukupan broj FP prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	PPA	NPA
Nadbubrežna žlijezda	16	6	4	1	11 823	2	607	80	> 99,9
Mjehur	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Dojke	16	3	3	0	13 439	7	479	100	99,9
Debelo crijevo	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Jetra	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Jajnici	13	7	7	0	10 581	1	724	100	> 99,99
Gušterača	17	7	7	0	11 929	12	489	100	99,9
Štitnjača	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Ukupno	109	39	36	1	78 975	29	3416	97,3	> 99,9

## Ponovljivost

Provedena su dva ispitivanja radi procjene ponovljivosti instrumenta MiSeqDx s DNK-om izdvojenim iz FFPE uzoraka. U 1. ispitivanju upotrebljavano je više instrumenata. U 2. ispitivanju sudjelovalo je više centara.

### 1. ispitivanje

Ponovljivost instrumenta MiSeqDx utvrđena je na dva instrumenta s dva obučena rukovatelja u ukupno osam obrada. Reprezentativna analiza, genomski kontekst amplikona, uzorci i referentna metoda isti su kao što je prethodno opisano za 1. ispitivanje točnosti. Rezultati su predstavljeni za svaki amplikon za svaki instrument (Tablica 17) da bi se dokazala ponovljivost prepoznavanja na različitim instrumentima. Postotak točnih prepoznavanja obuhvaćao je i netočna prepoznavanja i neprepoznavanja (nije zadovoljen jedan filtar ili više njih za prepoznavanje varijante). Instrumenti su generirali slične brojeve neprepoznavanja ovisnih o određenom amplikonu. Za MiSeqDx 1 zabilježeno je jedno netočno prepoznavanje u pouzdanom području prema referentnom standardu „platinastih genoma“. Netočno prepoznavanje bilo je lažno pozitivno prepoznavanje varijante insercije na amplikonu 64 pri ispitivanju kromosoma 10 na položajima od 55892599 do 55892687. Amplikon je imao 11 ponavljanja dinukleotida.

Tablica 17 Rezultati ispitivanja ponovljivosti na različitim instrumentima MiSeqDx (na razini amplikona)

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), indel	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10), indel	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Nije primjenjivo	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), indel	0,31	5211	0	43	5214	0	40
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), indel	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Nije primjenjivo	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), indel	0,42	4378	0	2	4379	0	1

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
17	3	93	93	AT(3), indel	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Nije primjenjivo	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), indel	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Nije primjenjivo	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), indel	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), indel	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), indel	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0
37	6	100	94	GCT(5), indel	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), indel	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Nije primjenjivo	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), indel	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Nije primjenjivo	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1



Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
51	8	83	83	Nije primjenjivo	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC(4), indel	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Nije primjenjivo	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), indel	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), indel	0,47	4679	0	1	4680	0	0
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), indel	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Nije primjenjivo	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Nije primjenjivo	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Nije primjenjivo	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
69	11	100	100	Nije primjenjivo	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Nije primjenjivo	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Nije primjenjivo	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), indel	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Nije primjenjivo	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Nije primjenjivo	0,52	4380	0	0	4379	0	1
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), indel	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), TA (3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Nije primjenjivo	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), indel	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), indel	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Nije primjenjivo	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Nije primjenjivo	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), indel	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
107	17	87	87	PolyC (5), indel	0,67	5212	0	8	5212	0	8
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Nije primjenjivo	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), indel	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	CTC(3), indel	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	CT(3), indel	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Nije primjenjivo	0,48	3900	0	0	3900	0	0

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
124	19	99	99	Nije primjenjivo	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Nije primjenjivo	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Nije primjenjivo	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Nije primjenjivo	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	AC(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	CT(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	4200	0	0	4200	0	0
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), indel	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), indel	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyA (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Nije primjenjivo	0,68	5819	0	1	5819	0	1

Amplikon	Kromosom	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja	Ukupno točnih prepoznavanja	Ukupno netočnih prepoznavanja	Ukupan broj neprepoznavanja
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Nije primjenjivo	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Nije primjenjivo	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Y	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Y	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Y	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Rezultati ispitivanja ponovljivosti analizirani su za svakog rukovatelja zasebno putem učestalosti varijanti [Tablica 18](#). Analizom se utvrdilo da su učestalosti varijante za sve rukovatelje bile dosljedne. Predstavljene su srednje učestalosti varijanti uz standardnu devijaciju +/- 1.

Tablica 18 Rezultati za MiSeqDx Instrument za svakog rukovatelja zasebno

Raspon učestalosti varijanti	Broj jedinstvenih varijanti	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 1	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 2	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 1	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 2
Velika učestalost (~100 %)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Srednja učestalost (~50 %)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Raspon učestalosti varijanti	Broj jedinstvenih varijanti	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 1	Ukupan broj analiziranih varijanti za rukovatelja 2	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 1	Srednja (SD) prijavljena učestalost varijanti za rukovatelja 2
Mala učestalost (3 - 7 %)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Rezultati ispitivanja ponovljivosti za svaki uzorak prikazani su zajedno za svih osam obrada [Tablica 19](#). Prepoznavanje se procjenjuje za svaku vrstu varijante zasebno – jednonukleotidne varijante, insercije i delecije. Referentni se položaji ne računaju. Tom se analizom pokazalo da su rezultati za varijante ponovljivi na više uzoraka.

Tablica 19 Podudarnost rezultata prepoznavanja baza na instrumentu MiSeqDx po uzorku

Uzorak	SNV-ovi				Insercije				Brisanja			
	Ukupan broj	Ukupan broj TP-a	Ukupan broj FP-a	Ukupan broj FN-a	Ukupan broj	Ukupan broj TP-a	Ukupan broj FP-a	Ukupan broj FN-a	Ukupan broj	Ukupan broj TP-a	Ukupan broj FP-a	Ukupan broj FN-a
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>Varijante s učestalošću većom od 20 %.

<sup>2</sup>Varijanta s učestalošću manjom od 20 %.

Podaci dobiveni iz 8 obrada tijekom ispitivanja ponovljivosti podržavaju tvrdnju da instrument MiSeqDx može dosljedno sekvencirati:

- sadržaj GC-a  $\geq 19\%$  (sve su prepoznate baze u 120 od 120 sekvenciranih amplikona s 19 % sadržaja GC-a prepoznate točno uz stopu neprepoznavanja od 3,4 %)

- sadržaj GC-a  $\leq 73\%$  (sve su prepoznate baze u 120 od 120 sekvenciranih amplikona sa 73 % sadržaja GC-a prepoznate točno uz stopu neprepoznavanja od 0,1 %)
- duljine PolyA  $\leq 8$  (ponavljanje PolyA od 8 nukleotida točno je prepoznato u 120 od 120 sekvenciranih amplikona koji sadrže PolyA = 8)
- duljine PolyT  $\leq 10$  (ponavljanje PolyT od 10 nukleotida točno je prepoznato u 120 od 120 sekvenciranih amplikona koji sadrže PolyT = 10)
- duljine PolyG  $\leq 6$  (ponavljanje PolyG od 6 nukleotida točno je prepoznato u 720 od 720 sekvenciranih amplikona koji sadrže PolyG = 6)
- duljine PolyC  $\leq 6$  (ponavljanje PolyC od 6 nukleotida točno je prepoznato u 359 od 360 sekvenciranih amplikona koji sadrže PolyC = 6, uz jedno neprepoznavanje)
- duljine dinukleotidnih ponavljanja  $\leq 4x$  (sve su prepoznate baze u 600 od 600 sekvenciranih amplikona koji sadrže 4x ponavljanje dinukleotida točno prepoznate uz stopu neprepoznavanja od 0,4 %)
- duljine trinukleotidnih ponavljanja  $\leq 5x$  (sve su prepoznate baze u 120 od 120 sekvenciranih amplikona koji sadrže 5x ponavljanje trinukleotida točno prepoznate uz stopu neprepoznavanja od 1,9 %)
- 24 ili manje insercija baza te 25 ili manje delecija baza
  - 24-bazne insercije točno su prepoznate u 120 od 120 uzoraka
  - 25-bazne delecije točno su prepoznate u 182 uzorka te prijavljene kao neprepoznavanje u 2 od 184 uzoraka.

## 2. ispitivanje

Provedeno je vanjsko ispitivanje radi procjene ponovljivosti reprezentativne analize dva gena opisane u 2. ispitivanju na tri vanjske lokacije testiranja (dva rukovatelja po lokaciji), s jednom serijom reagensa i tijekom tri neuzastopna dana testiranja. Testiranje je izvršeno na šest dobro karakteriziranih panela uzoraka genomskog DNK-a iz FFPE kliničkih uzoraka ili linija stanica. Svaki se panel sastojao od 10 članova, tj. ukupno 60 članova na svim panelima.

60 članova panela sastojalo se od duplikata četiriju uzoraka jedinstvenih divljih tipova (za mutacije panela), 12 jedinstvenih uzoraka mutacija (s jednom mutacijom) pripremljenih i s visokom i s niskom razinom učestalosti mutacije te dva jedinstvena uzorka mutacija (s jednom mutacijom) pripremljena samo s niskom razinom učestalosti mutacije. Ako su svi rezultati valjani, svaki jedinstveni uzorak / uzorak razine učestalosti mutacije (testiran u duplikatu pri svakoj obradi) imao bi 36 mogućih rezultata (2 replike x 2 rukovatelja x 3 dana x 3 lokacije).



Postotak očekivanih prepoznavanja (Percent Expected Call, PEC) za sve pozitivne i negativne varijante procijenjen je usporedbom rezultata reprezentativne analize s rezultatima očekivane mutacije (očekivana mutacija otkrivena ili neotkrivena) za svaki uzorak. PEC se izračunava kao 100 puta broj očekivanih prepoznavanja podijeljeno s brojem pokušaja prepoznavanja. Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunava se prema Wilsonovoj formuli.

Na svim lokacijama zajedno stope prolaznosti uzorka bile su  $\geq 94,7\%$  za prvu obradu uzorka ili za uzorke testirane u obradama koje su bile valjane pri prvoj prolaznosti. PEC na razini mutacije za sve mutirane uzorke bio je 99,6 % (905/909) (95-postotni interval pouzdanosti; 98,9, 99,8). Broj pokušaja prepoznavanja na svih 56 mutacija panela (bez obzira na to je li otkrivena mutacija bila očekivana) za sve valjane uzorke bio je 58 856 (56 x 1051). Od 58 856 opažanja na razini mutacija samo je u šest slučajeva došlo do neslaganja između opaženih i očekivanih rezultata. PEC na razini mutacije za sve pozitivne i negativne varijante svih mutiranih članova panela i članova divljeg tipa zajedno bio je 99,99 % (58 850/58 856).

## **Analitička osjetljivost (granica praznog uzorka [Limit of Blank, LoB] i granica otkrivanja [Limit of Detection, LoD])**

U tom se ispitivanju potvrđivala gornja granica analize te utvrđivala granica otkrivanja (LoD) za MiSeqDx uz pomoć reprezentativnog panela. Stanične linije dobro okarakteriziranog kompozita „platinastog genoma“ GM12878 i GM12877 nakratko su fiksirane u formalinu i uklopljene u parafin, a potom je izdvojen DNK. GM12878 razrijeđen je linijom GM12877 tako da su učestalosti sedamdeset varijanti (52 jednonukleotidne varijante, devet insercija i devet delecija) bile otprilike 0,05. Dva su uzorka DNK-a testirala dva rukovatelja na dva instrumenta uz pomoć dvije serije reagensa, pri čemu je bilo ukupno 10 obrada sekvenciranjem na instrumentu MiSeqDx. To je dalo 40 replika za svaku varijantu u liniji GM12878 i 60 replika za svaku odgovarajuću koordinatu divljeg tipa u liniji GM12877 za svaku seriju reagensa. LoB i LoD izračunati su uz upotrebu klasičnog pristupa navedenog u dokumentu CLSI EP17-A2 te opcije bez parametara. LoB i LoD za jednonukleotidne varijante, umetanja i brisanja izračunati su zasebno stvaranjem skupova učestalosti varijanti za svaku vrstu varijanti. Pogreška vrste I definirana je kao 0,01, a pogreška vrste II kao 0,05.

U slučaju LoB-a, učestalosti varijanti objedinjenih u skupove sortirane su od najmanje do najveće te je izračunat položaj na 99. mjestu za svaku seriju reagensa za svaku vrstu varijante ([Tablica 20](#)). Softver za MiSeqDx za određivanje kvalitativnog otkrivanja varijanti upotrebljava graničnu vrijednost (efektivni LoB) 0,026 učestalosti varijanti. Izračunatim granicama praznog uzorka potvrđeno je da ta granična vrijednost uzrokuje pogrešku vrste I od maksimalno 0,01.

Tablica 20 Granica praznog uzorka

Vrsta varijante	Ukupan broj učestalosti varijante	LoB za seriju reagensa 1 (%)	LoB za seriju reagensa 2 (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Umetanje	540	0,79	0,60
Brisanja	540	0,96	0,84

U slučaju LoD-a, izračunat je postotak učestalosti pojedinačnih mutacija za svaku seriju reagensa za svaku vrstu varijante koja je manja od granične vrijednosti 0,026 (Tablica 21). Postoci su bili manji od pogreške vrste II koja iznosi 5 % (0,05), pa je medijan kombiniranih učestalosti varijanti izračunat kao LoD (Tablica 21). Kao LoD za svaku vrstu varijante uzeta je veća od dviju vrijednosti izračunatih za dvije serije reagensa – 5,45 % za jednonukleotidne varijante, 4,88 % za insercije i 5,44 % za delecije.

Tablica 21 Granica prepoznavanja

Serija reagensa	Vrsta varijante	Ukupan broj učestalosti varijante	Broj mjerenja učestalosti varijante < 2,6 %	% mjerenja učestalosti varijante < 2,6 %	Granica prepoznavanja (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Umetanje	360	0	0,00	4,86
	Brisanja	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Umetanje	360	0	0,00	4,88
	Brisanja	360	0	0,00	5,24

U sljedećim ispitivanjima dokazivale su se radne karakteristike instrumenta MiSeqDx s drugom reprezentativnom analizom usmjerenom na 56 mutacija dvaju klinički relevantnih karcinomskih gena (panel mutacija). Panel mutacija posebno je osmišljen za otkrivanje 56 mutacija na dva klinički relevantna karcinomska gena (gen 1 i gen 2). Analizom se istovremeno utvrđuje prisutnost ili neprisutnost svake od 56 mutacija u svakom sekvenciranom uzorku. Referentna metoda za ta ispitivanja bilo je dvosmjerno Sangerovo sekvenciranje.

## Preciznost među serijama

Ispitivanje preciznosti među serijama provedeno je radi procjene radnih karakteristika instrumenta MiSeqDx s više serija gotovih kompleta reagensa (koji se sastoje od kvalifikacije uzoraka, pripreme biblioteka i reagensa za sekvenciranje) uz pomoću dvaju reprezentativnih analiza gena na panelu od pet objedinjenih FFPE uzoraka koji zadovoljavaju uvjete za kvalifikaciju uzorka. Svaki je FFPE

uzorak sadržavao dvije jedinstvene mutacije: jednu na donjoj razini (otprilike 8 %) učestalosti mutacija, a drugi na gornjoj razini (otprilike 14 %) učestalosti mutacija. Prikupljeno je dvanaest (12) opažanja svake od pet mješavina uzoraka tijekom tri neuzastopna dana i uz pomoć triju serija kompleta reagensa. Ukupan broj opažanja tijekom ispitivanja za sve serije reagensa bio je 180 za sve mješavine uzoraka te 360 za sve razine učestalosti mutacija. Za sve serije i tijekom svih dana 99,7 % (359/360) opažanja dalo je očekivani rezultat mutacije. Jedna mutacija male učestalosti netočno je prepoznata kao divlji tip. Analizom varijance za svaku mutaciju / razinu učestalosti mutacija procijenjena je varijabilnost sustava. Ukupna standardna devijacija bila je u rasponu od 0,011 do 0,029. Komponenta serije reagensa u ukupnoj standardnoj devijaciji bila je u rasponu od 0 do 0,015.

## Povijest revizija

Dokument #	Datum	Opis promjene
Dokument # 200006218 v02	listopad 2023.	Ažurirane su reference za Local Run Manager za verziju 4. Ažurirana je oznaka kako bi se dodali podaci o australskom naručitelju ispitivanja. Ispravljena su odstupanja u kojima se upute razlikuju od izvješća o ispitivanju provjere instrumenta za MiSeqDx.
Dokument # 200006218 v01	svibanj 2022.	U odjeljak Neobavezna oprema i materijal koji su priloženi dodan je kataloški broj za Upute za MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. U odjeljak Radne karakteristike dodane su informacije o testiranju kompleta MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro. Iz upozorenja i mjera opreza uklonjena je napomena o oprezu specifična za SAD.
Dokument # 200006218 v00	studeni 2021.	Prvo izdanje za podršku MOS v4.0 i Local Run Manager v3.0.

## Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodom(ima) opisanima u njemu(ima). Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licencije zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano osoblje s odgovarajućom izobrazbom mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

**AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVOD(E).**

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI JE(SU) OPISAN(I) U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TOG(TIH) PROIZVODA I SOFTVER).

© 2023 Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili svojih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Podaci za kontakt



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 SAD  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se nalaze na pakiranju proizvoda i naljepnica potražite u legendi simbola na web-mjestu [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na kartici *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.