

Листок-вкладыш

для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO. ТОЛЬКО ДЛЯ ЭКСПОРТА.

Номер по каталогу 20005715

Целевое назначение

Прибор NextSeq 550Dx предназначен для секвенирования библиотек ДНК с использованием тест-систем для диагностики *in vitro*. Прибор NextSeq 550Dx предназначен для использования с определенными зарегистрированными, сертифицированными или одобренными реагентами для диагностики *in vitro* и аналитическим программным обеспечением.

Принципы проведения процедуры

Прибор Illumina NextSeq 550Dx служит для секвенирования библиотек ДНК в ходе диагностического анализа *in vitro* и предназначен для использования квалифицированным и обученным персоналом клинической лаборатории, прошедшим подготовку для проведения диагностических процедур *in vitro* в клинической лаборатории. В качестве входных данных NextSeq 550Dx использует библиотеки, полученные из ДНК. В таких библиотеках индексы образцов и последовательности для захвата добавлены к амплифицированным целевым фрагментам. Библиотеки образцов захватываются на проточной ячейке и секвенируются на приборе с помощью химической реакции секвенирования путем синтеза (SBS). В химической реакции SBS используется метод обратимых терминаторов для обнаружения однонуклеотидных оснований с флуоресцентной меткой по мере их встраивания в растущие нити ДНК. Программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA) выполняет анализ изображения и определение последовательности нуклеотидов, а также присваивает оценку качества каждому основанию в каждом цикле секвенирования. По завершении первичного анализа вторичный анализ может быть выполнен на приборе для обработки распознанных оснований. В зависимости от рабочего процесса на приборе NextSeq 550Dx используются различные модули для вторичного анализа. Для модулей Germline Variant Module или Somatic Variant Module обработка включает в себя демультиплексирование, генерирование файлов FASTQ, выравнивание, определение вариантов и генерирование файлов в формате распознавания вариантов (VCF и gVCF). В файлах VCF и gVCF содержится информация о вариантах, обнаруженных в определенных позициях в эталонном геноме.

Конфигурация многовариантной загрузки

Для прибора NextSeq 550Dx предусмотрена конфигурация многовариантной загрузки для использования прибора только в режиме диагностики (Dx) или исследования (RUO, Research Use Only). Анализы диагностического секвенирования *in vitro*, в том числе модули Germline Variant Module и Somatic Variant Module, выполняются в режиме диагностики. В режиме диагностики можно использовать только реагенты

секвенирования IVD. Эксплуатационные параметры и ограничения процедуры для прибора NextSeq 550Dx были установлены с использованием модулей Germline Variant Module и Somatic Variant Module в режиме диагностики.

Ограничения процедуры

1. Предназначено для диагностики *in vitro*.
2. При использовании модулей Germline Variant Module или Somatic Variant Module с наборами NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) или NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) данные модули могут обеспечивать:
 - выходные данные секвенирования ≥ 90 гигабайт (Гб);
 - длину прочтения (в запуске парноконцевого прочтения) 2×150 пар оснований (п. о.);
 - основания со значениями не менее $Q30 \geq 75\%$ при длине прочтения 2×150 п. о.
К основаниям со значением не менее 75% относятся те, у которых по шкале Фреда показатели качества ≥ 30 , что соответствует точности распознавания оснований более $99,9\%$.
3. Программное обеспечение для анализа не выравнивает прочтения со вставками-делециями (вставками, делециями или их комбинациями) длиной > 25 пар оснований (п. о.). Следовательно, программное обеспечение для анализа не обнаруживает вставки-делеции длиной > 25 п. о.
4. Программное обеспечение для анализа может не выравнивать прочтения ампликонов с очень высоким содержанием варианта, вследствие чего участок будет зарегистрирован как дикий тип. Очень высокое содержание предполагает указанные ниже случаи.
 - Прочтения, содержащие более трех вставок-делеций.
 - Прочтения длиной не менее 30 п. о. с содержанием однонуклеотидных вариантов (SNV, single nucleotide variant) $> 4\%$ от общей целевой длины ампликона (за исключением участков зонда).
 - Прочтения длиной < 30 п. о. с содержанием SNV $> 10\%$ от общей длины ампликона (включая участки зонда).
5. Большие варианты, включая мультинуклеотидные варианты (MNV, multinucleotide variant) и большие вставки-делеции, могут быть указаны в файле выходных данных в формате VCF как отдельные варианты меньшего размера.
6. Варианты делеции могут быть отфильтрованы или пропущены при охвате двух ампликонов в области сканирования, если длина делеции не меньше длины наложения между двумя ампликонами области сканирования.
7. Система не может определять вставки-делеции, если они непосредственно прилегают к праймеру и налагающийся ампликон отсутствует. В случае участков с налагающимися ампликонами в ходе анализа невозможно обнаружить делеции, если участок наложения меньше размера делеции, которую необходимо обнаружить. Например, если участком наложения между двумя прилегающими ампликонами являются два основания, анализ не позволяет обнаружить делеции, включающие оба эти основания. Одноосновная делеция одного этих двух оснований может быть обнаружена.

8. Как и при любом рабочем процессе подготовки библиотек на основе гибридизации, лежащие в основе полиморфизмы, мутации, вставки или делеции в олигонуклеотидно-связанных участках могут влиять на аллели, подлежащие зондированию, и распознавания, выполняемые во время секвенирования. Например:
 - вариант в фазе с вариантом в участке праймера может не быть амплифицирован, что приводит к получению ложноотрицательного результата;
 - варианты на участке праймера могут предотвращать амплификацию эталонного аллеля, что приводит к некорректному распознаванию гомозиготного варианта;
 - варианты вставки-делеции на участке праймера могут приводить к ложноположительному распознаванию в конце прочтения, прилегающего к праймеру.
9. Вставки-делеции можно фильтровать в связи с субъективными параметрами нити, если они наблюдаются в конце одного прочтения и отсекаются мягко во время выравнивания.
10. Малые MNV не были валидированы и указываются только при применении модуля Somatic Variant Module.
11. Делеции указываются в VCF в координате предыдущего основания в соответствии с форматом VCF. Поэтому необходимо учитывать прилегающие варианты, прежде чем указывать, что отдельное распознаваемое основание является гомозиготным эталоном.
12. Ниже указаны ограничения, связанные с вариантами зародышевой линии.
 - Прибор NextSeq 550Dx с модулем Germline Variant Module программного обеспечения Local Run Manager для NextSeq 550Dx предназначен для получения качественных результатов распознавания вариантов зародышевой линии (например, гомозиготных, гетерозиготных, дикого типа).
 - При использовании модуля Germline Variant Module минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания вариантов, составляет 150x. В результате чего требуется 150 дополнительных фрагментов ДНК, что равно 300 налагающимся парноконцевым прочтениям. Число образцов и общее число целевых оснований влияют на покрытие. На покрытие могут влиять GC-состав и другой геномный состав.
 - Вариация числа копий может влиять на определение варианта как гомозиготного или гетерозиготного.
 - Варианты в определенном повторном контексте отфильтровываются в файлах VCF. Фильтр повторностей RMxN используется для фильтрации вариантов, если вся или часть последовательности варианта наблюдается повторно в эталонном геноме, прилегающем к позиции варианта. Для распознавания вариантов зародышевой линии требуется не менее девяти повторов в референсном геноме, чтобы вариант был отфильтрован. Учитываются только повторы, длина которых составляет 5 п. о. (R5x9).
 - Наличие вставки-делеции и варианта SNV в одном локусе может привести к регистрации только одного из вариантов.
13. Ниже приводятся ограничения, связанные с соматическими вариантами.
 - Прибор NextSeq 550Dx с модулем Somatic Variant Module программного обеспечения Local Run Manager для NextSeq 550Dx предназначен для получения качественных результатов распознавания соматических вариантов (например, наличия соматического варианта с частотой варианта, равной или превышающей 0,026 при пределе обнаружения 0,05).

- При использовании модуля Somatic Variant Module минимальное покрытие на ампликон, необходимое для точного распознавания вариантов, составляет 450x на пул олигонуклеотидов. В результате требуется 450 дополнительных фрагментов ДНК на олигонуклеотидный пул, что равно 900 налагающимся парноконцевым прочтениям. Число образцов и общее число целевых оснований влияют на покрытие. На покрытие могут влиять GC-состав и другой геномный состав.
- Для распознавания соматических вариантов требуется не менее шести повторов в референсном геноме, чтобы вариант был отфильтрован, при этом учитываются только повторы длиной до 3 п. о. (R3x6).
- Модуль Somatic Variant Module не позволяет отличить варианты зародышевой линии и соматические варианты. Этот модуль предназначен для обнаружения вариантов в диапазоне частот вариантов, но частота вариантов не может быть использована для разделения соматических вариантов и вариантов зародышевой линии.
- Ткань без патологий в образце влияет на обнаружение вариантов. Регистрируемый предел обнаружения основан на частоте варианта относительно общей ДНК, выделенной как из опухоли, так и из нормальной ткани.

Компоненты изделия

В состав Illumina NextSeq 550Dx входят следующие компоненты:

1. Прибор NextSeq 550Dx (номер по каталогу 20005715)
2. Компоненты программного обеспечения для Прибор NextSeq 550Dx, включая следующие.

Программное приложение	Функция	Описание
Программное обеспечение прибора NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Контроль управления прибором	Программное приложение NOS позволяет управлять прибором во время секвенирования и генерировать изображения для использования программным обеспечением Real-Time Analysis (RTA).
Программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA)	Выполнение первичного анализа	Программное приложение RTA позволяет конвертировать изображения, сгенерированные NOS для каждой области сканирования в цикле запуска секвенирования, в файлы распознанных оснований, которые содержат входные данные аналитических модулей Local Run Manager. Программное приложение RTA не имеет пользовательского интерфейса.

Программное приложение	Функция	Описание
Local Run Manager	Интерфейс для выбора модуля	Local Run Manager является встроенным программным обеспечением для управления пользователями, выбора соответствующего аналитического модуля и мониторинга статуса.
Somatic Variant Module	Выполнение вторичного анализа	Это программное обеспечение аналитического модуля в составе Local Run Manager позволяет обрабатывать распознанные основания с помощью вторичного анализа. Обработка включает в себя демультимплексирование, генерирование файлов FASTQ, выравнивание, определение вариантов и составление отчетности. Определитель вариантов (Pisces) генерирует файлы в формате VCF, в которых содержится информация о вариантах, обнаруженных в определенных позициях эталонного генома, и использует измеренную частотность вариантов.
Germline Variant Module	Выполнение вторичного анализа	Это программное обеспечение аналитического модуля в составе Local Run Manager позволяет обрабатывать распознанные основания с помощью вторичного анализа. Обработка включает в себя демультимплексирование, генерирование файлов FASTQ, выравнивание, определение вариантов и составление отчетности. Определитель вариантов (Pisces) генерирует файлы в формате VCF, в которых содержится информация о вариантах, обнаруженных в определенных позициях эталонного генома, и определяет, является ли вариант гетерозиготным или гомозиготным.

3. Необязательно Сервер Illumina DRAGEN для NextSeq 550Dx (номер по каталогу 20086130), включая следующий программный компонент:

Программное приложение	Функция	Описание
Illumina Run Manager	Интерфейс для выбора прикладного модуля	Программное обеспечение Illumina Run Manager установлено на дополнительном сервере DRAGEN, вне прибора Illumina Run Manager обеспечивает управление пользователями, выбор модуля анализа, а также мониторинг выполнения секвенирования и состояния анализа.

Дополнительный сервер Illumina DRAGEN для NextSeq 550Dx доступен только в некоторых странах. Свяжитесь с представителем Illumina для получения информации о наличии в регионе.

Условия эксплуатации

Подробнее об условиях эксплуатации см. в раздел «Экологические требования» руководства по подготовке рабочего места прибора *NextSeq 550Dx* (документ No 100000009869).

Параметр	Спецификация
Температура	Температура в лаборатории должна поддерживаться на уровне 19-25 °C (22 °C ± 3 °C). Это рабочая температура прибора. Когда запускается секвенирование, колебания температуры окружающей среды не должны превышать ±2 °C.
Влажность	Относительная влажность без конденсации должна поддерживаться на уровне 20-80 %.

Последние рекомендации по безопасности, предупреждения и информация для систем Illumina см. в разделе [Безопасность и работа в сети](#).

Оборудование и материалы

Необходимое оборудование и материалы, которые продаются отдельно

Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 циклов), номер по каталогу 20028870.

Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов), номер по каталогу 20028871.

Необходимое оборудование и материалы (в комплект не входят)

Поставляемые пользователем расходные материалы для запусков секвенирования

Расходный материал	Поставщик	Назначение
Спиртовые салфетки, 70 %-ный изопропиловый спирт или Этиловый спирт, 70 %	VWR, № по каталогу 95041-714 (или эквивалент) Поставщик общелабораторного оборудования	Очистка проточной ячейки; общего назначения
Лабораторные салфетки из безворсового материала	VWR, № по каталогу 21905-026 (или эквивалент)	Очистка проточной ячейки; общего назначения

Поставляемые пользователем расходные материалы для обслуживания прибора

Расходный материал	Поставщик	Назначение
NaOCl, 5 % (гипохлорит натрия)	Sigma-Aldrich, номер по каталогу 239305 или эквивалент лабораторного класса	Мытье прибора с использованием функции ручной промывки после запуска; разбавленный до 0,12 %
Твин 20	Sigma-Aldrich, номер по каталогу P7949	Мытье прибора с использованием функции ручной промывки после запуска; разбавленный до 0,05 %
Вода, ультрачистая	Поставщик общелабораторного оборудования	Мытье прибора (ручная промывка)
Воздушный фильтр	Illumina, номер по каталогу 20063988	Очистка воздуха, который поступает в прибор для охлаждения

Указания в отношении ультрачистой воды

При работе с прибором используйте только ультрачистую или деионизированную воду. Запрещается использовать водопроводную воду. Используйте воду только следующих классов или эквиваленты:

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

Предупреждения и меры предосторожности



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Федеральный закон разрешает продажу этого изделия только врачам или другим практикующим специалистам, имеющим лицензию штата, в котором они осуществляют медицинскую практику, или по предписанию таких лиц, с целью использования такими врачами/специалистами или использования по их предписанию.

1. Некоторые компоненты реагентов, предоставляемые компанией Illumina для использования с прибором Прибор NextSeq 550Dx содержат потенциально опасные химические вещества. При их вдыхании, проглатывании, попадании на кожу или в глаза существует опасность причинения вреда здоровью. Используйте соответствующие риску средства индивидуальной защиты, в том числе защитные очки, перчатки и лабораторный халат. С использованными реагентами следует обращаться как с химическими отходами и удалять их в отходы в соответствии с действующими региональными, государственными и местными законами и нормативными актами. Информацию о защите окружающей среды, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности (SDS, Safety Data Sheet) по адресу support.illumina.com/sds.html.
2. Обращайтесь со всеми образцами крови, как если бы было известно, что они заражены вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита В или другими переносимыми кровью патогенами (универсальные предостережения).
3. Несоблюдение описанных процедур может привести к получению ошибочных результатов или значительному снижению качества образцов.
4. Соблюдайте обычные меры предосторожности при работе в лаборатории. Запрещается пипетировать ртом. Запрещается употреблять продукты питания и напитки или курить в обозначенных рабочих зонах. При работе с образцами и реагентами набора следует надевать одноразовые перчатки и лабораторный халат. После работы с образцами и реагентами для набора следует тщательно вымыть руки.

5. Для предотвращения загрязнения реагентов, инструментов и образцов геномной ДНК продуктами полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо соблюдать надлежащие стандарты лабораторной практики и надлежащую гигиену в лаборатории. Загрязнение продуктами ПЦР может привести к получению неточных и недостоверных результатов.
6. Для предотвращения загрязнения в зонах преамплификации и постамплификации следует использовать отдельное оборудование и расходные материалы (например, пипетки, наконечники пипеток, нагревательные блоки, вихревые мешалки и центрифуги).
7. Взаимное соответствие индекса и образца должно точно отвечать распечатанной схеме плашки. Программное обеспечение Local Run Manager автоматически распространяет праймеры индекса, связанные с названиями образцов при их введении в модуль. Перед началом запуска секвенирования пользователю рекомендуется верифицировать праймеры индекса, связанные с образцами. Несовпадения между образцом и схемой плашки приводят к невозможности положительной идентификации образца и некорректному отображению результатов.
8. Для защиты компьютера от вирусов настоятельно рекомендуется установить антивирусное программное обеспечение пользователя. За инструкциями по установке обращайтесь к руководству пользователя.
9. Запрещено использовать NextSeq 550Dx с извлеченными панелями. Использование прибора со снятыми панелями создает риск воздействия напряжения из сети и постоянного напряжения.
10. Запрещено касаться столика проточной ячейки в отсеке проточной ячейки. Нагреватель в данном отсеке работает при температуре 22-95 °C и может стать причиной ожогов.
11. Прибор весит примерно 185 фунтов (84 кг), его падение или неправильное обращение с ним может привести к серьезной травме.
12. Компания Illumina осознает постоянную потребность в управлении угрозами кибербезопасности, чтобы ознакомиться с последними рекомендациями по безопасности, предупреждениями и информацией для систем Illumina, см. раздел [Безопасность и сетевые решения](#).

Инструкции по применению

Ниже приведены инструкции по использованию Прибор NextSeq 550Dx необходимых реагентов, входящих в комплект реагентов высокой производительности NextSeq 550Dx (NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5), версия 2.5 (300 циклов) или комплект реагентов высокой производительности NextSeq 550Dx (NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5), версия 2.5 (75 циклов).

Создание запуска

Создайте запуск секвенирования с помощью Local Run Manager или Illumina Run Manager. Инструкции по применению Local Run Manager приведены ниже и в NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочное руководство к прибору NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513). Инструкции по созданию запуска с помощью Illumina Run Manager см. в Руководство по программному обеспечению Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (документ No 200025239).

Инструкции по выбору между Local Run Manager или Illumina Run Manager см. в разделе Руководство по программному обеспечению Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (документ No 200025239). Подробные инструкции по конкретным приложениям см. руководстве по применению модуля или приложения для конкретного анализа.

Следующие инструкции относятся к использованию модулей Local Run Manager Germline и Somatic Variant.

Настройка параметров

1. Войдите в программное обеспечение Local Run Manager.
2. Выберите Create Run (Создать запуск) и выберите Somatic Variant (Соматический вариант) или Germline Variant (Зародышевый вариант).
3. Укажите название запуска, позволяющее идентифицировать запуск в секвенировании в ходе анализа. Используйте буквенно-цифровые символы, пробелы, символы подчеркивания или дефисы.
4. [Необязательно] Введите описание запуска, чтобы идентифицировать его. Используйте буквенно-цифровые символы, пробелы, символы подчеркивания или дефисы.
5. Выберите количество образцов и набор индексов из раскрывающегося списка. При выборе нужно учитывать следующую информацию.
 - В раскрывающемся списке содержится количество образцов с набором индексов. Например, 24-Set 1 указывает на 24 образца, которые необходимо протестировать, с индексами из набора индексов 1.
 - Номера наборов индексов относятся к различным наборам индексных пар i5 и i7. Наборы 1 и 2 обеспечивают разнообразие индексов. Для предотвращения истощения одного набора предлагаются два набора индексов.
 - Выберите количество образцов, которое ближе всего к количеству образцов, которые вы тестируете. Если точного количества образцов нет в списке, выберите ближайшее число, но меньше, чем число, которое вы тестируете. Например, если вы хотите протестировать 18 образцов, выберите 16 образцов.
 - Предлагаемые лунки для проб и индексные комбинации, которые соответствуют требованиям к разнообразию индексов, выделены зеленым цветом.

Импорт файлов манифеста для запуска

1. Убедитесь, что все манифесты, которые необходимо импортировать, доступны в сетевом расположении, подключенном к прибору, или на USB-носителе.
2. Нажмите Import Manifests (Импорт манифестов).
3. Перейдите к файлу манифеста и выберите манифесты, которые вы намерены добавить.

ПРИМЕЧАНИЕ Чтобы открыть доступ ко всем файлам манифеста для всех запусков с помощью аналитического модуля Germline Variant или Somatic Variant, добавьте манифесты с помощью функции Module Settings (Параметры модуля). Для данной функции требуются разрешения пользователя на уровне администратора. Для получения дополнительной информации см. *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочное руководство к прибору NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513)*.


Порядок указания образцов для запуска

Укажите образцы для запуска с помощью одного из вариантов и в соответствии с указаниями, приведенными далее.

Ввести образцы вручную – воспользуйтесь пустой страницей на экране Create Run (Создать запуск).


Импортировать образцы – перейдите ко внешнему файлу в формате (*.csv), в котором значения разделены запятыми. Шаблон для загрузки находится на экране Create Run (Создать запуск).

Введение образцов вручную

1. Введите уникальное название образца (для аналитического модуля *Somatic Variant*) или идентификационный номер образца (для аналитического модуля *Germline Variant*).
Используйте буквенно-цифровые символы, тире или символы подчеркивания.
2. [Необязательно] Для образцов положительных или отрицательных контролей нажмите правую кнопку мыши и выберите тип контроля.
Название контроля в одной лунке для образца автоматически указывается в названии соответствующей лунки в другом пуле с тем же контролем.
3. [Необязательно] Введите описание образца в поле Sample Description (Описание образца).
Используйте буквенно-цифровые символы, тире или символы подчеркивания.
4. Выберите индексный адаптер 1 из раскрывающегося списка Индекс 1 (i7).
При использовании предложенных лунок для образцов программное обеспечение автоматически заполняет индексные адаптеры i7 и i5, которые соответствуют требованиям к различию индексов. Если в списке не указано точное число образцов, которые вы анализируете, обязательно выберите индексные адаптеры для дополнительных лунок.
5. Выберите индексный адаптер 2 из раскрывающегося списка Индекс 2 (i5).
6. Выберите файл манифеста из раскрывающегося списка «Манифест».
Для образцов в пуле А требуется манифест, отличный от манифеста для образцов в пуле В.
7. Выберите соответствующий параметр, чтобы просматривать, распечатывать или сохранять макет планшета в качестве справочника для подготовки библиотек.
 - Нажмите значок  Print (Печать), чтобы отобразить макет планшета. Нажмите Print (Печать), чтобы распечатать макет планшета.

- Нажмите Export (Экспорт), чтобы экспортировать информацию об образце во внешний файл.
8. Нажмите Save Run (Сохранить запуск).

Импорт образцов

1. Выберите Import Samples (Импортировать образцы) и перейдите к расположению файла информации об образце. Существует два типа файлов, которые можно импортировать.
 - Выберите Template (Шаблон) на экране Create Run (Создать запуск), чтобы создать новый макет планшета. Файл шаблона содержит правильные заголовки столбцов для импорта. Введите информацию об образцах в каждый столбец для образцов в данном запуске. Удалите пример информации в неиспользуемых ячейках, а затем сохраните файл.
 - Используйте файл с информацией об образце, который был экспортирован из модуля Germline Variant или Somatic Variant с помощью функции Export.
2. Нажмите значок  Print (Печать), чтобы отобразить макет планшета.
3. Нажмите Print (Печать), чтобы распечатать схему плашки в качестве справочника для подготовки библиотек.
4. Нажмите Save Run (Сохранить запуск).

Подготовка картриджа с реагентами

Для успешного секвенирования обязательно соблюдайте указания к картриджу с реагентами.

1. Извлеките картридж с реагентами из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
2. Для размораживания реагентов применяйте один из следующих методов. Не погружайте картридж в воду. Перед переходом к следующему этапу высушите размороженный картридж.

Температура	Время размораживания	Предел стабильности
Водяная баня с температурой от 15 °C до 30 °C	60 минут	Время не должно превышать 6 часов.
от 2 °C до 8 °C	7 часов	Не более 5 дней

ПРИМЕЧАНИЕ Для размораживания нескольких картриджей в одной водяной бане понадобится дополнительное время.

3. Переверните картридж пять раз для перемешивания реагентов.
4. Осмотрите дно картриджа, чтобы убедиться, что реагенты разморожены и не содержат осадка. Поскольку позиции 29, 30, 31 и 32 самые тяжелые и размораживаются дольше всего, убедитесь, что они разморожены.
5. Осторожно постучите картриджем по поверхности стола, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха.

Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска.

Подготовка проточной ячейки

1. Извлеките новую проточную ячейку из места хранения с температурой от 2 до 8 °С.
2. Снимите с коробки фольгированную упаковку и оставьте при комнатной температуре на 30 минут.

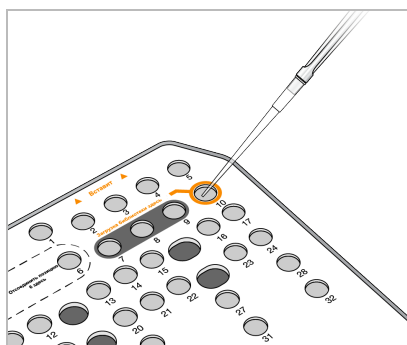
Подготовка библиотек к секвенированию

Денатурируйте и разведите библиотеки до загрузочного объема 1,3 мл. На практике загрузочная концентрация может колебаться в зависимости от методик подготовки библиотеки и количественного определения. Порядок разведения библиотек образца зависит от сложности пулов олигонуклеотидов. Указания насчет порядка подготовки библиотек образца для секвенирования, в том числе разведение и объединение библиотек, см. в разделе «Инструкции по применению» для применимого набора подготовки библиотек. При использовании прибора NextSeq 550Dx требуется оптимизация плотности кластера.

Загрузка библиотек на картридж с реагентами

1. Протрите крышку из фольги, закрывающую емкость № 10 с маркировкой Load Library Here (Место загрузки библиотеки), салфеткой из низковорсовой ткани.
2. Проколите крышку чистым наконечником пипетки на 1 мл.
3. Загрузите 1,3 мл подготовленных библиотек в емкость № 10 с маркировкой Load Library Here (Место загрузки библиотеки). Не касайтесь крышки из фольги во время распределения библиотек.

Рисунок 1 Загрузка библиотек



Настройка запуска секвенирования

Полную инструкцию настройки запуска см. в документе NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочное руководство к прибору NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513).

1. Войдите в систему NextSeq 550Dx с помощью пароля программного обеспечения Local Run Manager или Illumina Run Manager.

2. На экране Home (Главная страница) программного обеспечения NOS выберите Sequence (Последовательность).
3. Выберите запуск из списка, затем нажмите Next (Далее).
В приведенном далее порядке откроется серия экранов с настройкой запуска: Load Flow Cell (Загрузка проточной ячейки), Load Buffer Cartridge (Загрузка картриджа с буфером), Load Reagent Cartridge (Загрузка картриджа с реагентами) и Pre-run Check (Проверка перед запуском).

ПРИМЕЧАНИЕ Доступ к запускам возможен только с использованием того же менеджера запусков, который использовался при планировании запуска. Инструкции по настройке программного обеспечения Run Manager см. в разделе Руководство по программному обеспечению Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (документ No 200025239).

4. При появлении экрана Load Flow Cell (Загрузка проточной ячейки) очистите и загрузите проточную ячейку.
 - Извлеките проточную ячейку из упаковки из фольги.
 - Откройте защелкивающуюся прозрачную пластмассовую упаковку и достаньте проточную ячейку.
 - Очистите стеклянную поверхность проточной ячейки безворсовой спиртовой салфеткой. Протрите стекло низковорсной лабораторной салфеткой.
 - Убедитесь в чистоте стеклянной поверхности проточной ячейки. При необходимости повторите этап очистки.
 - Извлеките проточную ячейку, использованную в предыдущем запуске.
 - Воспользуйтесь направляющими штырями, чтобы установить проточную ячейку на соответствующем столике.
5. Нажмите Load (Загрузка).
Дверца автоматически закроется, на экране появится идентификационный номер проточной ячейки, и будет выполнена проверка датчиков.
6. Следуйте подсказкам, чтобы опорожнить использованный контейнер для реагентов, загрузить картридж с буфером NextSeq 550Dx и загрузить картридж с реагентом NextSeq 550Dx.
После загрузки картриджей с буфером и реагентом NextSeq 550Dx программное обеспечение считывает и записывает радиочастотную идентификацию (RFID). На экране появляются ИИ картриджа с буфером и картриджа с реагентом, и выполняется проверка датчиков.
7. После завершения автоматической проверки перед запуском нажмите Start (Пуск). (Не требуется, если запуск начинается автоматически.)
8. В начале запуска открывается экран Sequencing (Секвенирование). На экране отображается выполняемый запуск, включая значения интенсивности и показатели качества (показатели Q).

Результаты

Встроенное программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA) выполняет анализ изображения и определение последовательности нуклеотидов, а также присваивает оценку качества каждому основанию в каждом цикле секвенирования. По завершении первичного анализа выбранный модуль приложения автоматически начинает вторичный анализ. Процессы вторичного анализа, описанные здесь, предназначены для модулей Local Run Manager Germline Variant Module и Somatic Variant Module на Прибор NextSeq 550Dx.

Демультиплексирование

Демультиплексирование позволяет сравнивать последовательность прочтения индекса с индексными последовательностями, указанными для запуска. Параметры качества на данном этапе не учитываются.

Порядок идентификации прочтения индекса указан ниже.

- Образцам присваивают номера, начиная с 1, в соответствии с порядком, в котором они указаны для запуска.
- Образец номер 0 зарезервирован для кластеров, не назначенных для образца.
- Кластеры назначают образцу, если данная индексная последовательность совпадает точно или при наличии не более одного несовпадения на прочтение индекса.

Генерирование файла FASTQ

После демультиплексирования программное обеспечение генерирует промежуточные файлы анализа в текстовом формате FASTQ, используемом для представления последовательностей. Файлы FASTQ содержат прочтения для каждого образца и связанные оценки качества. Кластеры, не прошедшие через фильтр, исключаются.

В каждом файле FASTQ содержатся прочтения только для одного образца, название такого образца включено в имя файла FASTQ. В модулях Germline Variant Module и Somatic Variant Module восемь файлов FASTQ генерируются на один образец на пул олигонуклеотидов (oligo pool), четыре из прочтения 1 и четыре из прочтения 2. Этот результат дает в общей сложности 8 и 16 файлов FASTQ на образец для Germline и Somatic соответственно. Файлы FASTQ содержат первичные входные данные для выравнивания.

Выравнивание

На этапе выравнивания попарный алгоритм Smith-Waterman позволяет выравнивать кластеры из каждого образца по отношению к последовательности ампликона, указанной в файле манифеста.

Попарный алгоритм Smith-Waterman выполняет полуглобальное выравнивание последовательностей для определения подобных участков в двух последовательностях. Вместо сравнения всей последовательности алгоритм Смита – Уотермана сравнивает сегменты всех возможных длин.

Каждое парноконцевое прочтение оценивается с точки зрения его выравнивания относительно соответствующих последовательностей зондов для этого прочтения.

- Прочтение 1 оценивается относительно обратнoкомплементарного участка нисходящего локус-специфического олигонуклеотида (DLSO, downstream locus-specific oligo).
- Прочтение 2 оценивается относительно восходящего локус-специфического олигонуклеотида (ULSO, Upstream Locus-Specific Oligo).
- Если начало прочтения совпадает с последовательностью зонда, а количество несовпадений при этом не превышает одного, полная длина прочтения выравнивается по отношению к мишени ампликона для данной последовательности.
- Если начало прочтения совпадает с последовательностью зонда, а количество отличий при этом не превышает три (несовпадения или смещения в связи с ведущими вставками-делециями), полная длина прочтения выравнивается по отношению к мишени ампликона для данной последовательности.
- Вставки-делеции в DLSO и ULSO не наблюдаются, учитывая химическую реакцию анализа.

Фильтрацию выравниваний выполняют по результатам выравнивания на основании величин несовпадения на участке, представляющем интерес, или в полном ампликоне – в зависимости от длины ампликона. Отфильтрованные выравнивания записываются в файлах выравнивания как невыровненные и не используются при определении вариантов.

Распознавание вариантов

Определитель вариантов Pisces предназначен для выполнения распознаваний SNV и вариантов вставки-делеции из библиотек, подготовленных для прибора.

Отчеты и дополнительные файлы выходных данных

Аналитические модули вариантов выдают отчеты в формате PDF и с разделителями табуляции (*.txt), в которых отражены такие показатели, как глубина секвенирования и подсчет вариантов. Модули также генерируют файлы выходных данных в таких форматах, как VCF и genome Variant Call Format (gVCF), для приложений определения вариантов.

Процедуры контроля качества

Программное обеспечение NextSeq 550Dx оценивает каждый запуск, образец и распознанное основание в соответствии с параметрами контроля качества. При приготовлении библиотеки также рекомендованы положительные и отрицательные контроли, и их необходимо оценивать. Оценка контролей выполняется следующим образом.

- Отрицательный контроль (контроль без матрицы) или другой отрицательный контроль: должен сгенерировать ожидаемый результат. Если отрицательный контроль генерирует результат, отличающийся от ожидаемого, то, возможно, возникла ошибка в процессе отслеживания образца или записи праймеров индекса или произошло загрязнение.
- Образец положительного контроля: должен сгенерировать ожидаемый результат. Если положительный контроль генерирует результат, отличающийся от ожидаемого, то, возможно, возникла ошибка в процессе отслеживания образца или записи праймеров индекса.

Рабочие характеристики

Рабочие характеристики прибора Прибор NextSeq 550Dx были определены с помощью модулей Germline Variant Module и Somatic Variant Module с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и подтверждены с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Исследование включало индексирование образца, перенос образца, анализ входного сигнала ДНК, аналитической чувствительности (предел холостой пробы / предел обнаружения), точности, прецизионности, воспроизводимости и сравнение методов.

Аналитические исследования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) были разработаны для оценки заявленных характеристик, ранее установленных с помощью набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). Результаты продемонстрировали, что наборы реагентов (v2 и v2.5) имеют сравнимые характеристики при использовании набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Эксплуатационные характеристики, связанные с преаналитическими факторами, такими как методы извлечения и интерферирующие вещества, см. в листке-вкладыше к набору *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Определения расчетов, используемых для эксплуатационных параметров

1. Показатель согласованности положительных результатов (PPA, Positive Percent Agreement) рассчитывается как доля локусов, классифицированных как варианты по эталонному методу, которые были правильно зарегистрированы в процессе анализа.
 - $(\text{Число локусов вариации, корректно зарегистрированных в процессе анализа}) / (\text{общее число локусов вариации})$Локусы варианта, зарегистрированные в процессе анализа, согласующиеся с эталонным методом, являются истинноположительными (TP). Локусы варианта, в ходе анализа зарегистрированные в качестве эталонных распознаваний или в качестве других распознаваний вариантов, являются ложноотрицательными (FN, false negative).
2. Показатель согласованности отрицательных результатов (NPA, Negative Percent Agreement) рассчитывается как доля локусов, классифицированных как дикий тип по эталонному методу, которые были правильно зарегистрированы в процессе анализа.

- $(\text{Число локусов дикого типа, правильно зарегистрированных в процессе анализа}) / (\text{общее число локусов дикого типа})$.

Локусы дикого типа, зарегистрированные в процессе анализа, которые согласуются с эталонным методом, являются истинноотрицательными (TN). Локусы дикого типа, зарегистрированные в процессе анализа как варианты, являются ложноположительными (FP, false positive).

3. Показатель общей согласованности (OPA) рассчитывается как доля локусов, правильно зарегистрированных в ходе анализа, относительно результатов, полученных эталонным методом.
 - $((\text{Число локусов варианта, правильно зарегистрированных в ходе анализа}) + (\text{число локусов дикого типа, правильно зарегистрированных в ходе анализа})) / ((\text{общее число локусов варианта}) + (\text{общее число локусов дикого типа}))$
4. При вычислении значений PPA, NPA и OPA не учитываются распознавания (локусы варианта или эталона, не соответствующие одному или нескольким фильтрам качества).
5. Аутосомная частота распознавания рассчитывается как общее число локусов, проходящих через фильтр, разделенное на общее число позиций, секвенированных для хромосом 1-22; хромосомы X и Y исключены. Данный параметр не учитывает согласованность распознаваний с эталонным методом.

Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов)

Индексирование образца

Выполните отбор праймеров индекса, добавленных во время подготовки библиотеки, присвойте уникальную последовательность каждому образцу ДНК. Данные уникальные последовательности позволяют создавать пулы нескольких образцов для одного запуска секвенирования. Индексирование образца применяется для рабочих процессов как модуля варианта зародышевой линии, так и модуля соматической линии. Целью данного исследования было установление минимального (8) и максимального (96) количества образцов, которые можно обработать в одном запуске секвенирования на приборе Прибор NextSeq 550Dx. Восемь уникальных образцов Platinum Genome подвергли тестированию с использованием 12 различных сочетаний праймера индекса на образец. Результаты анализа образца от четырех запусков секвенирования с применением модуля Germline Variant Module сравнили с Platinum Genomes версии 2016-1.0.

Для первого набора запусков были испытаны 96 библиотек с уникальными индексированными образцами в ходе репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований на нить во всех 23 хромосомах человека с целью проверки пригодности анализа к устойчивому созданию генотипного распознавания для определенного образца в различных сочетаниях праймера индекса. Для второго набора запусков выполнили секвенирование восьми библиотек с уникальными индексированными образцами в двух запусках секвенирования для проверки минимального числа поддерживаемых индексов.

Для запусков с 96 индексами значение PPA для SNV находилось в диапазоне 98,7-100 %, PPA для вставок и делеций составило 100 %, а NPA составило 100 % для каждой из 96 комбинаций индексов. В запусках с 8 индексами значения PPA составили 100 % (SNV, вставки и делеции) и NPA 100 % для каждой из восьми комбинаций индекса.

Перенос образцов

Прибор NextSeq 550Dx позволяет выполнять секвенирование нескольких образцов и контролировать единый запуск секвенирования. Было проведено исследование для оценки переноса образца в пределах запуска секвенирования (в пределах запуска) и между запусками секвенирования (от запуска к запуску). Два образца Platinum Genome – один мужской и один женский – были протестированы с помощью репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, охватывающих 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах, включая хромосомы обоих полов. Было выполнено секвенирование библиотек на приборе NextSeq 550Dx с применением модуля Germline Variant Module. Перенос мужских образцов на женские образцы наблюдали по наличию прочтений ампликона Y-хромосомы в женских образцах.

Перенос в пределах запуска может быть выполнен в ходе генерации кластеров, определения последовательности нуклеотидов индексного цикла и демультимплексирования образца. Для испытания переноса образца в пределах запуска секвенирования один раз на приборе NextSeq 550Dx секвенировали пул библиотеки, содержащий 46 реплик всех мужских и женских образцов, а также четыре контроля без матрицы. Анализ переноса образца в пределах запуска выполнили путем сравнения охвата ампликона Y-хромосомы каждой женской реплики со средним охватом ампликона Y-хромосомы всех мужских реплик в пуле. Медианное значение, наблюдаемое для переноса в пределах запуска, составило 0,084 %.

Для тестирования переноса образца от запуска к запуску приготовили два пула библиотек и секвенировали их последовательно на приборе NextSeq 550Dx. Первый пул содержал 46 реплик женского образца и два контроля без матрицы. Второй пул содержал 46 реплик мужского образца и два контроля без матрицы. Для обоих пулов использовали один и тот же набор индексных адаптеров. Женский пул секвенировали первым, затем выполнили последующий запуск секвенирования с мужским пулом, а затем выполнили повторный запуск секвенирования женского пула. Перенос образца от запуска к запуску оценивали путем сравнения охвата ампликона Y-хромосомы между соответствующими репликами повторного запуска женского пула и запуска мужского пула. Медианное значение, наблюдаемое для переноса от запуска к запуску, составило 0,0076 %.

Входное значение ДНК

Кровь (Germline)

Для прибора Прибор NextSeq 550Dx был установлен диапазон входного сигнала ДНК крови для подготовки библиотеки с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx с применением рабочего процесса модуля Germline Variant Module. Оценка диапазона была выполнена путем проведения исследования серийного разведения с использованием 13 образцов Platinum Genome. При этом репрезентативный анализ разработан для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. Библиотека была секвенирована на двух приборах NextSeq 550Dx с использованием одной партии набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов).

Были протестированы пять образцов в двух повторностях на пяти входных уровнях ДНК в диапазоне от 250 нг до 12 нг (250 нг, 100 нг, 50 нг, 25 нг 12 нг). Были протестированы восемь образцов в одной повторности на каждом из пяти входных уровней ДНК. Для определения точности генотипы образца сравнивали с Platinum Genomes версии 2016-1.0. Результаты определяли для каждого входного уровня. Значения PPA для каждого

типа варианта (SNV, вставки и делеции) представлены в Таблица: 1 значения NPA представлены в Таблица: 2. Все входные уровни характеризовались схожей точностью. Рекомендованное входное значение ДНК для набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx 50 нг, при этом 25 нг и 100 нг составляют нижний и верхний предел, соответствующий эксплуатационным характеристикам.

Таблица: 1 Результаты PPA для каждого входного значения ДНК по типу варианта

Входное значение ДНК (нг)	Тип варианта	Ожидаемое число вариантов	TP	FN	Число нераспознаваний вариантов	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Вставка	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Делеция	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Таблица: 2 NPA для каждого входного значения ДНК

Входное значение ДНК (нг)	TN	FP	Число нераспознаваний эталона	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatic)

Для прибора NextSeq 550Dx был установлен зафиксированный формалином и залитый парафином (FFPE) диапазон входного сигнала ДНК крови для подготовки библиотеки с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx с применением рабочего процесса модуля Somatic Variant Module. Оценка диапазона входного сигнала ДНК была выполнена путем исследования серийного разведения с использованием трех образцов Platinum Genome и репрезентативного анализа, разработанного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. После извлечения ДНК клеточные линии Platinum Genome GM12878 и GM12877 были зафиксированы формалином и залиты парафином. Линия GM12878 была разбавлена линией GM12877 так, чтобы частоты вариантов аллелей (VAF, variant allele frequency) для 79 вариантов (55 SNV, 9 вставок и 15 делеций) составляли около 0,025, 0,05 или 0,10. Кроме того, каждый образец имел 91 вариант с более высокими частотами вариантов до VAF 1,0. Образцы были обработаны в двух повторностях на пяти уровнях входного сигнала ДНК со средним значением дельты количественного цикла (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 и 7,8, измеренным с помощью набора TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Каждая библиотека была секвенирована на двух приборах NextSeq 550Dx с использованием двух партий набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). Для определения точности, распознавания вариантов образцов сравнивали с Platinum Genomes версии 2016-1.0. Значения PPA для каждого типа варианта (SNV, вставки и делеции) представлены в [Таблица: 3](#) значения NPA представлены в [Таблица: 4](#). Рекомендованное значение входного сигнала ДНК для вариантов с VAF 0,05 или выше составляет $dCq \leq 4$, при этом 4,6 является нижним пределом, соответствующим эксплуатационным характеристикам.

Таблица: 3 Результаты PPA для каждого входного значения ДНК по типу варианта

Среднее значение dCq	Тип варианта	Ожидаемое число вариантов	Ожидаемое число нераспознаваний	VAF разбавления мишени					
				0,025		0,05		0,10	
				Число нераспознаваний вариантов	P PA (%)	Число нераспознаваний вариантов	P PA (%)	Число нераспознаваний вариантов	P PA (%)
2,1	SNV	808	Неприменимо	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100

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

Исследование было проведено для оценки предела LoB и LoD для модуля Somatic Variant Module прибора NextSeq 550Dx. Оценка была выполнена путем репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах. После извлечения ДНК клеточные линии Platinum Genome GM12878 и GM12877 были зафиксированы формалином и залиты парафином. Линия GM12878 была разбавлена линией GM12877 так, чтобы частоты вариантов для 74 вариантов (53 SNV, 7 вставок и 14 делеций) составляли $0,05 \pm 0,02$. Линия GM12877 и разбавленная линия GM12878 (GM12878-D) были подвергнуты испытаниям в течение 6 начальных дней подряд на одном приборе с попеременным использованием двух партий набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) в ходе шести запусков секвенирования. В результате этих тестов получено 60 реплик для каждого варианта в GM12878-D и 72 реплики для каждой соответствующей координаты дикого типа в GM12877 для каждой партии реагентов. Значения LoB и LoD были вычислены с применением классического подхода, указанного в CLSI EP17-A2, с применением непараметрического метода. Значения LoB и LoD были рассчитаны для SNV, вставок и делеций отдельно путем объединения частот вариантов для заданного типа варианта. Ошибка типа I была определена как 0,01, ошибка типа II была определена как 0,05.

Для значения LoB частоты объединенных вариантов были отсортированы от низшего к высшему. Была рассчитана позиция 99-го ранга для каждой партии реагента для каждого типа варианта (Таблица: 5). Для модуля Somatic Variant Module было использовано пороговое значение (эффективное значение LoB) VAF 0,026 для количественного определения вариантов. Рассчитанное значение LoB подтверждает, что данное пороговое значение приводит к ошибке типа I не более чем 0,01.

Таблица: 5 Предел холостой пробы

Тип варианта	Общее число наблюдений	Значение LoB партии реагента 1 (%)	Значение LoB партии реагента 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Вставка	504	0,56	0,56
Делеция	1008	1,20	1,20

Для значения LoD процентная доля индивидуальной частоты мутаций для каждой партии реагентов для каждого типа варианта ниже порогового значения 0,026 была рассчитана и приведена в Таблица: 6. Поскольку процентные доли составляли меньшее значение, чем ошибка типа II 5 % (0,05), медианное значение объединенных частот вариантов рассчитывали как значение LoD (Таблица: 6). Значение LoD для каждого типа варианта принимали как большее из двух значений, рассчитанных для двух партий реагентов: 4,97 % для SNV, 5,12 % для вставок и 5,26 % для делеций.

Таблица: 6 Предел обнаружения

Партия реагентов	Тип варианта	Общее число наблюдений	Число измерений VAF	Процентная доля измерений VAF	Предел обнаружения
------------------	--------------	------------------------	---------------------	-------------------------------	--------------------

			< 2,6 %	< 2,6 %	(%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Вставка	420	6	1,4	5,08
	Делеция	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Вставка	420	5	1,2	5,12
	Делеция	840	7	0,80	5,26

Точность

Germline

В следующем исследовании была проведена оценка точности распознавания варианта модуля Germline Variant Module с помощью прибора Прибор NextSeq 550Dx с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). 13 уникальных образцов Platinum Genome были подвергнуты испытанию с применением репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. Всего было выполнено девять запусков с применением трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов и с участием трех операторов в течение пяти начальных дней. Значения точности были определены для SNV, вставок и делеций путем сравнения результатов с хорошо изученным составным эталонным методом, Platinum Genomes версии 2016-1.0. Доверительные геномные области были определены на основе данного эталонного метода, если не указано иное.

Таблица: 7 Сводные данные согласованности зародышевой линии

Критерии	Общее число наблюдений ¹	Результат в разбивке по наблюдениям ²	Результат в разбивке по запускам ³
PPA для SNV	819	98,7	> 99,9
PPA для вставок	819	95,0	98,9
PPA для делеций	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹ Рассчитывается как число образцов на запуск (91) × число запусков (9) = 819.

² Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца во всех 9 запусках.

³ Минимальное значение, когда данные каждого запуска анализируются вместе.

В Таблица: 8 приведены данные исследования, представленные с положительной и отрицательной согласованностью для отдельного образца, где результаты варианта сравниваются с Platinum Genomes версии 2016-1.0 для расчетов PPA. Три типа вариантов (SNV, вставки и делеции) объединены. Поскольку эталонный метод позволяет получить результаты только для единичных нуклеотидных вариантов и вставок/делеций, результаты распознавания невариантных оснований сравнивают с результатами эталонного секвенирования генома человека в сборке hg19 для расчета NPA.

Таблица: 8 Согласованность зародышевой линии на образец

Образец	Средняя частота распознавания	Ожидаемое число вариантов ¹	TP	FN	Число нераспознаваемых вариантов	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Общее число вариантов во всех повторностях образца в 9 запусках.

В [Таблица: 9](#) приведены данные исследования, представленные для отдельного образца, где результаты анализа варианта сравниваются с хорошо изученным составным эталонным методом анализа. Обнаружение оценивают для каждого типа варианта – SNV, вставок и делеций – отдельно. Эталонные позиции исключены.

Таблица: 9 Согласованность зародышевой линии на образец по типу варианта

Образец	SNV			Вставки			Делеции		
	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Затем образцы были проанализированы для распознавания малых вставок и делеций (вставок-делеций). Общие сводные данные приведены в [Таблица: 10](#). Была обнаружена 71 вставка-делеция размером от 1 до 24 п. о. для вставок и от 1 до 25 п. о. для делеций.

Таблица: 10 Сводные данные об обнаружении вставок-делеций в модели зародышевой линии

Тип варианта	Ожидаемое число вариантов	TP	FN	Число нераспознаваний вариантов	PPA
Вставка	18522	18018	27	477	99,9
Делеция	17388	17073	0	315	100

Репрезентативный анализ состоял из 150 ампликонов, созданных для различного геномного состава. Диапазон GC-состава: 0,19-0,87. Для ампликонов также имеется диапазон единичных нуклеотидных (например, поли (А), поли (Т)), динуклеотидных и тринуклеотидных повторов. Данные были компилированы по ампликонам (Таблица: 11), чтобы определить влияние геномного состава на процентное содержание корректных распознаваний. Процентное содержание корректных распознаваний состоит из распознаваний варианта и эталонных распознаваний и составляет менее 100 %, если имеются некорректные распознавания или нераспознавания.

Таблица: 11 Точность модуля Germline на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Вставка-делеция	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли (А) (5), поли (С) (5), вставка-делеция	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Вставка-делеция	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Вставка-делеция	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли (G) (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли (Т) (10), вставка-делеция	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли (А) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Вставка-делеция	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Вставка-делеция	0,38	65520	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/П	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли (А) (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли (Т) (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли (Т) (5), поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Вставка-делеция	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), вставка-делеция	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/П	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), вставка-делеция	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5), поли (А) (9), ТG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Вставка-делеция	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли (А) (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли (G) (6), поли (Т) (5), поли (А) (5)	0,42	79443	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/П	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли (А) (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли (А) (7), вставка-делеция	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/П	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/П	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли (Т) (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG (3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Вставка-делеция	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли (G) (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Вставка-делеция	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), вставка-делеция	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли (Т) (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Вставка-делеция	0,53	77805	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли (С) (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли (А) (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/П	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Вставка-делеция	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли (А) (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Вставка-делеция	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли (G) (6), поли (С) (6), вставка-делеция	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/П	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Вставка-делеция	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/П	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли (G) (7), СТС(4), вставка-делеция	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Вставка-делеция	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли (G) (6)	0,67	80262	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
55	9	105586150	105586214	65	65	Вставка-делеция	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/П	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли (С) (6), вставка-делеция	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли (Т) (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли (А) (5), поли (Т) (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Вставка-делеция	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), вставка-делеция	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/П	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/П	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/П	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Вставка-делеция	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/П	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Вставка-делеция	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/П	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли (А) (5)	0,4	59787	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/П	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли (G) (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Вставка-делеция	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли (A) (5), CA(3), вставка-делеция	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли (C) (5), вставка-делеция	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли (A) (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/П	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли (A) (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли (G) (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/П	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли (A) (5), поли (T) (7), поли (A) (7), вставка-делеция	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Вставка-делеция	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Вставка-делеция	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/П	0,25	67977	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Вставка-делеция	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Вставка-делеция	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли (А) (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Вставка-делеция	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли (С) (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Вставка-делеция	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли (Т) (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Вставка-делеция	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/П	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Вставка-делеция	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/П	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли (С) (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли (С) (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли (С) (5), вставка- делеция	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Вставка- делеция	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Вставка- делеция	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли (Т) (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли (А) (13), вставка- делеция (×2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли (А) (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли (А) (7), АТ(3), АТ(4), АТ (4), вставка- делеция	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Вставка- делеция	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли (Т) (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/П	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли (А) (5), вставка- делеция	0,37	61425	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), вставка- делеция	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), вставка- делеция	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/П	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Н/П	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/П	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/П	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Н/П	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	ГТ(3), TG (4), вставка- делеция	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Вставка- делеция	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Вставка- делеция	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли (G) (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Вставка- делеция	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Вставка- делеция	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли (Т) (6), СА(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	ГТ(3), вставка- делеция	0,39	71253	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли (А) (6), AG(3), вставка-делеция	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли (Т) (5), поли (А) (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Вставка-делеция	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/П	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Вставка-делеция	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/П	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Вставка-делеция	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли (Т) (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли (С) (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/П	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	Н/П
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	Н/П
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли (А) (5)	0,37	0	0	0	Н/П

Результаты секвенирования образца NA12878 сравнили с параметрами генотипа NA12878 с высокой степенью достоверности, установленными Национальным институтом стандартов и технологий (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Из 150 ампликонов 92 полностью содержались внутри геномных участков с высокой степенью достоверности, 41 ампликон имел частичное наложение, и 17 ампликонов не имели наложения в последовательности NIST. В результате получено 10 000 координат на одну повторность для сравнения. Невариантные нуклеотидные основания сравнили с последовательностью референсного генома в сборке hg19. Результаты анализа точности приведены в [Таблица: 12](#).

Таблица: 12 Согласованность зародышевой линии образца NA12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средняя частота распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

На основании данных, представленных в данном исследовании модуля зародышевой линии в девяти запусках, может последовательно секвенировать Прибор NextSeq 550Dx:

- GC-состав $\geq 19\%$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в объеме 19 %, распознанных корректно с частотой нераспознавания 0,6 %);
- GC-состав $\leq 87\%$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах с GC-составом в объеме 87 %, распознанных корректно без нераспознаваний);
- значения длин хвостов поли (A) ≤ 9 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (A) девяти нуклеотидов, распознанных корректно без нераспознаваний);
- значения длин хвостов поли (A) ≤ 10 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (T) десяти нуклеотидов, распознанных корректно без нераспознаваний);
- значения длин хвостов поли (G) ≤ 7 (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (G) семи нуклеотидов, распознанных корректно с частотой нераспознавания 1,0 %);
- значения длин хвостов поли (C) ≤ 6 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (C) шести нуклеотидов, распознанных корректно без нераспознаваний);
- значения длин динуклеотидной повторности $\leq 11x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащие динуклеотидные повторности размером 11x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,5 %);
- значения длин тринуклеотидной повторности $\leq 5x$ (все распознанные основания в 819 секвенированных ампликонах, содержащие тринуклеотидные повторности размером 5x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,5 %);

- значения длины вставки ≤ 24 (66 343 из 66 370 распознанных оснований в 819 секвенированных ампликонах, содержащих 24-нуклеотидную вставку, распознанную корректно с частотой нераспознавания 1,2 %; отсутствие некорректных распознаваний в области, содержащей 24-нуклеотидную вставку);
- значения длин делеций ≤ 25 (все распознанные основания в 2457 секвенированных ампликонах, содержащих 25-нуклеотидную делецию, распознанную корректно без нераспознаваний).

Somatic

В описанном исследовании оценивали точность распознавания варианта модуля Somatic Variant на Прибор NextSeq 550Dx с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов).

Исследование было выполнено путем репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований (150 ампликонов) в 23 различных хромосомах. ДНК Platinum Genome была извлечена из зафиксированных формалином и залитых парафином блоков и использована в создании шести уникальных образцов для оценки исследования.

Образец ДНК GM12877 разбавили образцом ДНК GM12878 для создания GM12877-D5 и GM12877-D7 в качестве набора уникальных гетерозиготных вариантов с частотами вариантов примерно 5 % и 7 %. Образец ДНК GM12878 был аналогично разбавлен образцом ДНК GM12877 для создания GM12878-D5 и GM12878-D7. Каждый образец подвергли испытаниям в трех повторностях, кроме разбавленных образцов, которые подвергли испытаниям в шести повторностях. Всего было выполнено девять запусков с применением трех приборов для секвенирования, трех партий реагентов и с участием трех операторов в течение пяти начальных дней. Значения точности были определены для SNV, вставок и делеций путем сравнения результатов с хорошо изученным эталонным методом анализа состава, Platinum Genomes версии 2016-1.0. Доверительные геномные области были определены на основе данного эталонного метода, если не указано иное.

Таблица: 13 Сводные данные согласованности соматического варианта

Критерии	Общее число наблюдений ¹	Результат в разбивке по наблюдениям ²	Результат в разбивке по запускам ³
PPA для SNV	378	98,9	99,9
PPA для вставок	378	96,9	99,9
PPA для делеций	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹ Рассчитывается как число образцов на запуск (42) × число запусков (9) = 378.

² Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца во всех 9 запусках.

³ Минимальное значение, когда данные каждого запуска анализируются вместе.

В [Таблица: 14](#) приведены данные исследования, с процентом совпадения положительных и отрицательных результатов представленные по отдельным образцам, где результаты для варианта сравниваются с хорошо изученным составным эталонным методом анализа для расчетов PPA. Три типа вариантов (SNV, вставки и делеции) объединены. Поскольку эталонный метод позволяет получить результаты только для единичных нуклеотидных вариантов и вставок/делеций, результаты распознавания невариантных оснований сравнивают с результатами эталонного секвенирования генома человека в сборке hg19 для расчета NPA.

Таблица: 14 Согласованность соматического варианта на образец

Образец	Средняя частота распознавания	Ожидаемое значение	TP	FN	Число нераспознаваемых вариантов	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

В [Таблица: 15](#) приведены данные исследования, представленные для отдельного образца, где результаты анализа варианта сравниваются с хорошо изученным составным эталонным методом анализа. Обнаружение оценивают для каждого типа варианта – SNV, вставок и делеций – отдельно. Эталонные позиции исключены.

Таблица: 15 Согласованность соматического варианта на образец по типу варианта

Образец	SNV			Вставки			Делеции		
	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN	Ожидаемое значение	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Затем десять образцов были проанализированы для распознавания малых вставок и делеций (вставок-делеций) (Таблица: 16). Была обнаружена 71 вставка-делеция размером от 1 до 24 п. о. для вставок и от 1 до 25 п. о. для делеций.

Таблица: 16 Сводные данные об обнаружении вставок-делеций в модели соматического варианта

Тип варианта	Ожидаемое число вариантов	TP	FN	Число нераспознаваний вариантов	PPA
Вставка	10773	10282	9	482	99,2
Делеция	11502	10667	5	830	> 99,9

Для различного геномного состава было создано 150 ампликонов. Диапазон GC-состава: 0,19-0,87 %. Для ампликонов также имеется диапазон единичных нуклеотидных (например, поли (А), поли (Т)), динуклеотидных и тринуклеотидных повторов. Данные были компилированы по ампликонам (Таблица: 17), чтобы определить влияние геномного состава на процентное содержание корректных распознаваний. Процентное содержание корректных распознаваний состоит из распознаваний варианта и эталонных распознаваний и составляет менее 100 %, если имеются некорректные распознавания или нераспознавания.

Таблица: 17 Точность модуля Somatic на уровне ампликона

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
1	1	36450499	36450591	93	93	Вставка-делеция	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Поли (А) (5), поли (С) (5), вставка-делеция	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Вставка-делеция	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Вставка-делеция	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Поли (G) (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Поли (Т) (10), вставка-делеция	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Поли (А) (5), СТ(3), ТАА(3), вставка-делеция	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Вставка-делеция	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Вставка-делеция	0,38	30218	0	22	99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
10	2	177016721	177016805	85	81	Н/П	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Поли (А) (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Поли (Т) (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Поли (Т) (5), поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Н/П	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	АТ(3), вставка-делеция	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Н/П	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	СТ(3), вставка-делеция	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Поли (А) (5), поли (Т) (5), поли (А) (9), ТG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Вставка-делеция	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Поли (А) (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Поли (G) (6), поли (Т) (5), поли (А) (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Н/П	0,29	29427	0	57	99,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
25	4	56236521	56236586	66	62	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Поли (А) (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Поли (А) (7), вставка-делеция	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Н/П	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	Н/П	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Поли (А) (6), вставка-делеция	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Поли (Т) (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	СТ(4), AG (3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Вставка-делеция	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Поли (G) (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Вставка-делеция	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	ГСТ(5), вставка-делеция	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Поли (Т) (5), ТСТ(3), СТТ (3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Вставка-делеция	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Поли (С) (6)	0,7	32438	0	70	99,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
41	6	41647401	41647495	95	94	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Поли (A) (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Н/П	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Вставка-делеция	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Поли (A) (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Вставка-делеция	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Поли (G) (6), поли (C) (6), вставка-делеция	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Н/П	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Вставка-делеция	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Н/П	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Поли (G) (7), CTC(4), вставка-делеция	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Вставка-делеция	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Поли (G) (6)	0,67	36968	0	76	99,8

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
55	9	105586150	105586214	65	65	Вставка-делеция	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Н/П	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	АТ(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Поли (С) (6), вставка-делеция	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Поли (Т) (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Поли (А) (5), поли (Т) (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Вставка-делеция	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	АС(11), вставка-делеция	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Н/П	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Н/П	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Н/П	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Вставка-делеция	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Н/П	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Вставка-делеция	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Н/П	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Поли (А) (5)	0,4	27516	0	78	99,7

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
73	11	101347052	101347136	85	85	Н/П	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Поли (G) (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Вставка-делеция	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Поли (A) (5), CA(3), вставка-делеция	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Поли (C) (5), вставка-делеция	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Поли (A) (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Н/П	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Поли (A) (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Поли (G) (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Н/П	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Поли (A) (5), поли (T) (7), поли (A) (7), вставка-делеция	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Вставка-делеция	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Вставка-делеция	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Н/П	0,25	31360	0	22	99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
89	14	46958962	46959034	73	72	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Вставка-делеция	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Вставка-делеция	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Поли (А) (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Вставка-делеция	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Поли (С) (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Вставка-делеция	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Поли (G) (5), вставка-делеция	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Поли (Т) (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Вставка-делеция	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Н/П	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Вставка-делеция	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Н/П	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Поли (С) (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	ТА(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Поли (С) (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Поли (Т) (5), вставка-делеция	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
107	17	3594191	3594277	87	87	Поли (С) (5), вставка-делеция	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Вставка-делеция	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Вставка-делеция	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Поли (Т) (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Поли (А) (13), вставка-делеция (×2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Поли (А) (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Поли (А) (7), АТ(3), АТ(4), АТ (4), вставка-делеция	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Вставка-делеция	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Поли (Т) (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Н/П	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Поли А (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Поли (А) (5), вставка-делеция	0,37	27923	0	893	96,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), вставка-делеция	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), вставка-делеция	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Н/П	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Н/П	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Н/П	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Н/П	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Н/П	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	ГТ(3), TG (4), вставка-делеция	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Вставка-делеция	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Вставка-делеция	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Поли (G) (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Вставка-делеция	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Вставка-делеция	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Поли (T) (6), СА(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	ГТ(3), вставка-делеция	0,39	32841	0	48	99,9

Ампликон	Хромосома	Начало ампликона	Конец ампликона	Размер анализируемого фрагмента	Основания в доверительных областях	Геномный состав ампликона	GC-состав	Корректные распознавания	Некорректные распознавания	Число нераспознаваний	Процентная доля корректных распознаваний
138	21	46644924	46644992	69	69	Поли (А) (6), AG(3), вставка-делеция	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Поли (Т) (5), поли (А) (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Вставка-делеция	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Н/П	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Вставка-делеция	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Н/П	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Вставка-делеция	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Поли (Т) (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Поли (С) (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Н/П	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Н/П	0,55	0	0	0	Н/П
149	Y	2655519	2655609	91	0	Н/П	0,48	0	0	0	Н/П
150	Y	2655609	2655679	71	0	Поли (А) (5)	0,37	0	0	0	Н/П

Результаты секвенирования образца GM12878 сравнили с параметрами генотипа NA12878 с высокой степенью достоверности, установленными NIST (v.2.19). Из 150 ампликонов 92 полностью содержались внутри геномных участков с высокой степенью достоверности, 41 ампликон имел частичное наложение, и 17 ампликонов не имели наложения в последовательности NIST. В результате получено 10 000 координат на одну повторность для сравнения. Невариантные нуклеотидные основания сравнили с последовательностью референсного генома в сборке hg19. Результаты анализа точности приведены в [Таблица: 18](#).

Таблица: 18 Согласованность соматического варианта образца GM12878 с базой данных NIST

Образец	Число ампликонов	Средняя частота распознавания	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

На основании данных, представленных в данном исследовании модуля соматического варианта в девяти запусках, Прибор NextSeq 550Dx может последовательно секвенировать:

- GC-состав $\geq 19\%$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в объеме 19 %, распознанных корректно с частотой нераспознавания 2,6 %);
- GC-состав $\leq 87\%$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах с GC-составом в объеме 87 %, распознанных корректно с частотой нераспознавания 0,6 %);
- значения длин хвостов поли (A) ≤ 9 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (A) девяти нуклеотидов, распознанных корректно с частотой нераспознавания 2,5 %);
- значения длин хвостов поли (T) ≤ 10 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (T) десяти нуклеотидов, распознанных корректно с частотой нераспознавания менее 0,1 %);
- значения длин хвостов поли (G) ≤ 6 (все распознанные основания в 2268 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (G) шести нуклеотидов, распознанных корректно с частотой нераспознавания 0,5 %);
- значения длин хвостов поли (C) ≤ 6 (все распознанные основания в 756 секвенированных ампликонах, содержащих повторность поли (C) шести нуклеотидов, распознанных корректно с частотой нераспознавания 0,4 %);
- значения длин динуклеотидной повторности $\leq 4x$ (все распознанные основания в 1890 секвенированных ампликонах, содержащих динуклеотидные повторности размером 4x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 0,9 %);
- значения длин тринуклеотидной повторности $\leq 5x$ (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих тринуклеотидные повторности размером 5x, были распознаны корректно с частотой нераспознавания 1,4 %);
- значения длин вставок ≤ 23 (все распознанные основания в 378 секвенированных ампликонах, содержащих 23-нуклеотидную вставку, распознанную корректно с частотой нераспознавания 0,8 %);

- значения длин делеций ≤ 25 (все распознанные основания в 1134 секвенированных ампликонах, содержащих 25-нуклеотидную делецию, распознанную корректно с частотой нераспознавания 0,7 %).

Прецизионность

Прецизионность Прибор NextSeq 550Dx была определена путем тестирования 13 уникальных образцов Platinum Genome с использованием трех приборов, трех партий реагентов и с участием трех операторов, при этом было создано девять запусков секвенирования в течение пяти начальных дней. Репрезентативный анализ, образцы и эталонный метод являются такими же, как и описанные для исследования точности модуля варианта зародышевой линии. Факторы прецизионности были определены путем анализа компонента варианта с использованием VAF в качестве итоговой переменной и расчета стандартных отклонений на уровне компонента для прибора, партии реагента, оператора и дня начала (Таблица: 19). Общее число наблюдений, используемых в анализе для каждого компонента прибора, оператора или изменчивости партии реагента, составило 699, 176 и 235 для SNV, вставок и делеций соответственно.

Таблица: 19 Результаты анализа прецизионности для прибора NextSeq 550Dx (стандартное отклонение)

Компонент	Тип варианта	СО компонента		Общее СО	
		Макс.	Медианное значение	Макс.	Медианное значение
Партия	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Вставка	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Делеция	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Прибор	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Вставка	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Делеция	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Оператор	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Вставка	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Делеция	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
День	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Вставка	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Делеция	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Сопоставление методов (платформа секвенирования)

Образцы цельной крови и образцы FFPE оценивали на приборах Прибор NextSeq 550Dx и MiSeqDx с применением рабочих процессов модуля варианта зародышевой линии и модуля соматического варианта для набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Совпадение частоты вариантов для образцов крови и FFPE оценивали с использованием нескольких репрезентативных анализов. На графике Рисунок 2 представлена корреляция VAF между двумя приборами для одного репрезентативного анализа, а в Таблица: 20 обобщена эта

корреляция по панели анализов. В связи с сильной корреляцией между приборами MiSeqDx и Прибор NextSeq 550Dx эксплуатационные характеристики, связанные с преаналитическими факторами (например, методики извлечения или интерферирующие субстанции), применимы к обоим приборам. Подробнее см. в листке-вкладыше к набору TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Рисунок 2 Корреляция VAF между приборами MiSeqDx и NextSeq 550Dx для образцов FFPE (слева) и крови (справа) с применением анализа 1

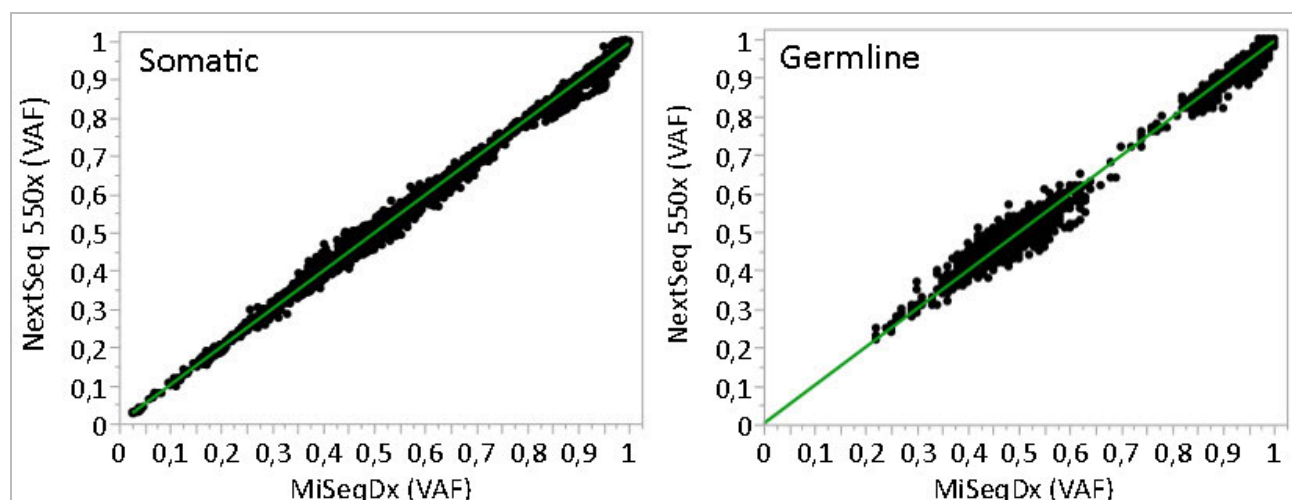


Таблица: 20 Результаты сопоставления методов с использованием уникальных образцов крови и FFPE

Источник gDNA	Анализ (олигонуклеотидная панель)	Биологические повторности (образцы)	Техническое повторности (на образец)	Наблюдения (число вариантов)	Угол наклона	Свободный коэффициент	Корреляция (R^2)
Кровь	Анализ 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Кровь	Анализ 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
ЗФЗП	Анализ 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
ЗФЗП	Анализ 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹ Две единицы данных были удалены на основании ограничения, указанного для модуля Germline Variant Module.

² Коэффициент определения для графиков VAF, как показано на рисунке 2.

Воспроизводимость

Воспроизводимость Прибор NextSeq 550Dx оценивали с использованием образцов Platinum Genome и применением репрезентативного анализа, предназначенного для поиска ряда генов, покрывающих 12 588 оснований в 23 различных хромосомах с использованием 150 ампликонов. Тестирование модуля

зародышевой линии включало семь реплик из 13 образцов; тестирование соматического модуля включало шесть реплик из семи образцов на различных уровнях VAF. Образцы подготовили с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Тестирование выполнили в трех внешних исследовательских центрах с использованием одной партии набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). В каждом исследовательском центре использовали один прибор NextSeq 550Dx. Испытание в каждом центре выполняли два оператора. Каждый оператор выполнял испытание в течение трех начальных дней (не подряд) для каждого типа образца в ходе 36 запусков в трех исследовательских центрах. Результатом данного испытания стали 18 запусков для рабочих процессов как модуля зародышевой линии, так и соматического модуля.

Germline

Варианты зародышевой линии с уровнем VAF $\geq 0,2$ отображаются в отчете как положительные (варианты). Для ожидаемых положительных вариантов зародышевой линии данные оценивали по частоте отсутствия распознавания и частоте корректного положительного распознавания для каждого типа вариантов (SNV, вставка, делеция). В [Таблица: 21](#) обобщены наблюдаемые показатели, а также нижний и верхний 95 % уровни достоверности (LCL/UCL), рассчитанные с использованием метода оценки Wilson, для каждого типа варианта.

Таблица: 21 Наблюдаемые распознавания вариантов зародышевой линии для ожидаемых положительных результатов по типу варианта

Тип варианта	Отсутствие распознаваний			Корректное положительное распознавание				
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Вставки	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Делеции	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Варианты зародышевой линии с уровнем VAF $< 0,2$ отображаются в отчете как отрицательные (дикого типа). Для ожидаемых отрицательных вариантов зародышевой линии данные оценивали по частоте отсутствия распознавания и частоте положительного распознавания дикого типа. В [Таблица: 22](#) обобщены наблюдаемые показатели, а также нижний и верхний 95 % уровни достоверности (LCL/UCL), рассчитанные с использованием метода оценки Wilson, для каждого типа варианта.

Таблица: 22 Наблюдаемые распознавания вариантов зародышевой линии для ожидаемых отрицательных результатов

Тип варианта	Отсутствие распознаваний			Корректное отрицательное распознавание				
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %
Дикий тип	4883	19 600 82	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Варианты зародышевой линии с уровнем VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ распознаются как положительные гетерозиготные для варианта, варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ распознаются как положительные гомозиготные для варианта. Образцы зародышевой линии с гетерозиготными вариантами использовали для определения, будет ли естественная изменчивость анализа влиять на распознавание генотипа. Для обоих пороговых значений модуля Germline Variant Module (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов) был определен параметр S_x , где x – доля повторных тестов, превышающих пороговое значение. Для нижнего порогового значения VAF 0,2 S_x составило $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что $\geq 99,999\%$ гетерозиготных вариантов будет распознано как гетерозиготные. Для верхнего порогового значения VAF 0,7 значение S_x составило $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будет распознано как гомозиготные. В [Таблица: 23](#) обобщены результаты по типу варианта.

Варианты зародышевой линии с уровнем VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ распознаются как положительные гетерозиготные для варианта, варианты с уровнем VAF $\geq 0,7$ распознаются как положительные гомозиготные для варианта. Образцы зародышевой линии с гетерозиготными вариантами использовали для определения, будет ли естественная изменчивость анализа влиять на распознавание генотипа. Для обоих пороговых значений модуля Germline Variant Module (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов) был определен параметр S_x , где x – доля повторных тестов, превышающих пороговое значение. Для нижнего порогового значения VAF 0,2 S_x составило $\geq 99,999\%$, что указывает на то, что $\geq 99,999\%$ гетерозиготных вариантов будет распознано как гетерозиготные. Для верхнего порогового значения VAF 0,7 значение S_x составило $\leq 0,001\%$, что указывает на то, что $\leq 0,001\%$ гетерозиготных вариантов будет распознано как гомозиготные. В [Таблица: 23](#) обобщены результаты по типу варианта.

Таблица: 23 Значения S_x модуля зародышевой линии для гетерозиготных вариантов

Тип варианта	Пороговое значение при VAF 0,2	Пороговое значение при VAF 0,7
	$\geq S_{99,999\%}$	$\leq S_{0,001\%}$
SNV	94/94	94/94
Вставки	24/24	24/24
Делеции	35/35	35/35
Итого	153	153

Somatic

Варианты соматического модуля с уровнем VAF $\geq 0,026$ отображаются в отчете как положительные (вариант). В целях данного анализа параметры наблюдения с уровнями VAF $\geq 0,01$ и $< 0,026$ считались сомнительными (ни положительными, ни отрицательными, отмеченные как имеющие частоту низкого варианта). Чтобы оценить эффективность, результаты рассчитали тремя способами.

- Наилучшее возможное значение: все сомнительные результаты считались корректным положительным распознаванием (согласованность с ожидаемыми результатами).
- Наихудшее возможное значение: все сомнительные результаты считались некорректным распознаванием (несогласованность с ожидаемыми результатами).
- Исключение: из анализа исключен сомнительный результат.

В трех таблицах – [Таблица: 24](#), [Таблица: 25](#), и [Таблица: 26](#) – приведены результаты распознавания для наилучшего возможного значения, наихудшего возможного значения и исключения соответственно, а также нижний и верхний уровень достоверности 95 % (LCL/UCL), рассчитанные с применением метода оценки Wilson.

Таблица: 24 Наблюдаемые распознавания соматического модуля для ожидаемых положительных результатов по типу варианта (наилучшее возможное значение)

Тип варианта	Корректное положительное распознавание				
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Вставки	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица: 25 Наблюдаемые распознавания соматического модуля для ожидаемых положительных результатов по типу варианта (наихудшее возможное значение)

Тип варианта	Корректное положительное распознавание				
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Вставки	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица: 26 Наблюдаемые распознавания соматического модуля для ожидаемых положительных результатов по типу варианта (удалены сомнительные распознавания)

Тип варианта	Корректное положительное распознавание				
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %

SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Вставки	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Варианты соматического модуля с уровнем VAF < 0,01 отображаются в отчете как отрицательные распознавания (дикого типа). Данные для ожидаемых расположений отрицательных распознаваний соматического модуля оценивали по частоте нераспознавания и частоте корректного распознавания дикого типа. Корректные определения дикого типа рассчитывали путем исключения случаев без определения и вычитания определений, попадающих в сомнительную зону (уровни VAF $\geq 0,01$ и $< 0,026$), а также некорректных определений, превышающих пороговое значение (уровни VAF $\geq 0,026$) из общего количества. В [Таблица: 27](#) обобщены наблюдаемые, общее количество и процентные результаты для отрицательных соматических локусов по частоте отсутствия определения и частоте корректного определения дикого типа, а также нижние и верхние границы 95 % доверительного интервала (LCL/UCL), рассчитанные с использованием метода оценки Wilson.

Таблица: 27 Наблюдаемые распознавания соматического модуля для ожидаемых отрицательных результатов

Вариация Тип	Отсутствие распознаваний			Корректные распознавания						
	Наблюдаемые распознавания	Итого	Процентная доля	Сомнительный результат	Некорректный результат	Корректный результат	Итого	Процентная доля	LCL 95 %	UCL 95 %
Дикий тип	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97 %	99,972	99,974

Соматические образцы на различных уровнях VAF для того же самого варианта рассчитывали с целью определения значения C95 анализа (в пределах каждого типа варианта). Чтобы оценить изменчивость возле порогового значения анализа, использовали образцы, ожидаемые уровни VAF которых составляли от 0,02 до 0,07. Значение C95 определили для каждого варианта, наивысшее значение C95 для каждого типа варианта указано в [Таблица: 28](#).

Таблица: 28 Краткие сведения о C95 при применении модуля Somatic

Тип варианта	N	C95
SNV	74	0,0613
Вставка	24	0,0573
Делеция	33	0,0575

Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов)

Обзор

С прибором NextSeq 550Dx используют два набора реагентов: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Чтобы продемонстрировать, что набор NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) может соответствовать требованиям к выполнению аналитических задач, проверенных и валидированных с помощью набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов), были проведены исследования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Была выполнена подготовка двух библиотек с использованием набора для диагностики TruSeq Custom Amplicon Kit Dx: одна с рабочим процессом для модуля зародышевой линии, а другая с рабочим процессом для соматического модуля. Библиотеки из каждого рабочего процесса были подвергнуты испытаниям с помощью трех серий набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) с применением трех приборов NextSeq 550Dx. Кроме того тестирование для каждого рабочего процесса включало в себя один запуск с применением набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов).

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

Результаты проверки с помощью набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) продемонстрировали, что прибор NextSeq 550Dx может обнаруживать варианты с VAF 0,05 с типом ошибки $II \leq 0,05$ и что пороговое значение VAF 0,026, используемое модулем Somatic Variant Module (эффективное значение предела холостой пробы (LoB, Limit of Blank)), позволяет добиться того, что ошибка типа I $\leq 0,01$. На основании таких утверждений ожидается, что вариант с VAF 0,05 будет не меньше 95 % периода при VAF 0,026 и что позиция дикого типа будет занимать 99 % периода при VAF 0,026. Чтобы убедиться, что данные утверждения справедливы для набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов), были проведены повторные измерения на приборе NextSeq 550Dx с использованием образцов дикого типа (образцов LoB) и образцов, содержащих варианты с VAF 0,05 (образцов предела обнаружения (LoD, Limit of Detection)), с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Затем соотношение распознаваний выше и ниже порогового значения 0,026 сравнили со значениями, полученными при использовании прибора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов).

Тестирование было выполнено на двух образцах LoD, каждый из которых имел уникальный набор вариантов с целевым значением VAF 0,05, и соответствующих образцах LoB дикого типа для целевых вариантов. Для подготовки библиотеки обрабатывали образцы LoD и LoB в повторностях восемь и семь соответственно с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Изначально библиотеки секвенировали с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов), чтобы идентифицировать варианты / геномные координаты для оценки LoB/LoD с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Все варианты со средним значением VAF от 0,045 до 0,055 (варианты LoD),

основанные на результатах использования набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов), применяли для анализа LoD (N = 51 вариант). Для анализа LoB оценивали 51 соответствующую геномную координату.

Для оценки набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) библиотеки секвенировали в ходе трех запусков в течение трех дней подряд с применением того же самого прибора и серии набора реагентов. В ходе тестирования использовали 24 повторности для каждого из 51 вариантов LoD и 21 повторность для каждой из соответствующих позиций дикого типа. Соотношение распознаваний дикого типа с VAF < 0,026 приведено в Таблица: 29. Соотношение LoD распознаваний вариантов со значением VAF, превышающим или равным 0,026, приведено в Таблица: 30.

Таблица: 29 Соотношение распознаваний < 0,026 для позиций дикого типа (заявленная оценка LoB)

Тип варианта	Оцененные позиции	Общее число наблюдений	Число измерений VAF ≥ 2,6 %	Соотношение < 2,6 %	Соотношение 95 % Доверительный интервал
SNV	32	672	0	1	0,994-1
Вставка	11	231	0	1	0,984-1
Делеция	8	168	0	1	0,978-1

Таблица: 30 Соотношение распознаваний VAF ≥ 0,026 для LoD вариантов (заявленная оценка значения LoD)

Тип варианта	Оцененные позиции	Общее число наблюдений	Число измерений VAF < 2,6 %	Число измерений VAF ≥ 2,6 %	Соотношение ≥ 2,6 %	Соотношение 95 % Доверительный интервал
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993-1
Вставка	11	264	3	261	0,989	0,967-0,996
Делеция	8	192	2	190	0,99	0,963-0,997

Точность

Germline

В следующем исследовании была проведена оценка точности распознавания варианта с помощью модуля Germline Variant Module с применением набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Двенадцать уникальных образцов Platinum Genome были протестированы с использованием репрезентативного анализа. С помощью трех приборов NextSeq 550Dx и трех наборов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) было выполнено всего 11 запусков.

Значения точности были определены для SNV, вставок и делеций путем сравнения результатов с хорошо изученным составным эталонным методом, Platinum Genomes версии 2016-1.0. Для справки приведены результаты по оценке точности из единственного запуска секвенирования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). Сводные данные по результатам приведены [Таблица: 31](#).

Таблица: 31 Сводные данные согласованности зародышевой линии

Критерии	Общее число наблюдений (v2.5) ¹	Результаты в разбивке по наблюдениям (v2.5) ²	Результаты в разбивке по наблюдениям (v2) ³	Результаты в разбивке по запускам (v2.5) ⁴	Результаты в разбивке по запускам (v2) ⁴
PPA для SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA для вставок	1056	100	100	100	100
PPA для делеций	1056	95,2	95,2	> 99,9	> 99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹ Рассчитывается как число образцов на запуск × число запусков (96 образцов в запуске × 11 запусков = 1056 наблюдений).

² Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца во всех запусках (на основании анализа 11 запусков для набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³ Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца в 1 запуске (всего 96 наблюдений).

⁴ Минимальное значение, когда данные каждого запуска анализируются вместе.

Somatic

В следующем исследовании оценивали точность распознавания варианта модуля Somatic Variant Module на приборе NextSeq 550Dx с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов). Образцы FFPE Platinum Genome (два с вариантами, разбавленными до VAF 0,05) подвергли испытаниям с применением репрезентативного анализа. Всего было выполнено 11 запусков с помощью трех приборов NextSeq 550Dx и трех наборов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов).

Значения точности были определены для SNV, вставок и делеций путем сравнения результатов с хорошо изученным составным эталонным методом, Platinum Genomes версии 2016-1.0. Для справки приведены результаты по оценке точности из единственного запуска секвенирования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). Сводные данные по результатам приведены в [Таблица: 32](#).

Таблица: 32 Сводные данные согласованности соматического варианта

Критерии	Общее число наблюдений (v2.5) ¹	Результат с разбивкой по наблюдениям	Результат с разбивкой по наблюдениям	Результаты с разбивкой по запускам	Результаты с разбивкой по запускам
----------	--	--------------------------------------	--------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------

		(v2.5) ²	(v2) ³	(v2.5) ⁴	(v2) ⁴
PPA для SNV	528	100	100	100	100
PPA для вставок	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA для делеций	528	100	100	100	100
NPА	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPА	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹ Рассчитывается как число образцов на запуск × число запусков (48 образцов в запуске × 11 запусков = 528 наблюдений).

² Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца во всех запусках (на основании анализа 11 запусков для набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³ Минимальное наблюдаемое значение с разбивкой по повторностям образца в 1 запуске (всего 96 наблюдений).

⁴ Минимальное значение, когда данные каждого запуска анализируются в совокупности.

Прецизионность

Germline

Прецизионность набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) при использовании с модулем Germline Variant Module была оценена с применением образцов Platinum Genome и репрезентативного анализа. Тестирование состояло из одной подготовки библиотеки с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, для чего было обработано 12 образцов с восемью репликами для каждого. Библиотеки были секвенированы с помощью трех серий набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) и трех приборов NextSeq 550Dx всего для девяти запусков секвенирования.

Чтобы определить, будет ли естественная изменчивость анализа влиять на распознавание генотипа, были использованы образцы с гетерозиготными вариантами (N = 153 уникальных гетерозиготных варианта). Для обоих пороговых значений модуля Germline Variant Module (0,2 для гетерозиготных и 0,7 для гомозиготных генотипов) был определен параметр C_x, где x – доля повторных тестов, превышающих пороговое значение. Для нижнего порогового значения VAF 0,2 значение варианта с минимальным C_x для набора NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 циклов) составило > 99,9 %, указывая на то, что > 99,9 % гетерозиготных вариантов будут распознаны как гетерозиготные. Для верхнего порогового значения VAF 0,7 значение варианта с максимальным C_x для набора NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 циклов) составило < 1,5 %, указывая на то, что ≤ 1,5 % гетерозиготных вариантов будут распознаны как гомозиготные. В [Таблица: 33](#) обобщены результаты по типу варианта. Значения C_x из единственного запуска секвенирования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) приведены для справки.

Таблица: 33 Значения Sx модуля зародышевой линии для гетерозиготных вариантов

Тип варианта	N	Пороговое значение при VAF 0,2		Пороговое значение при VAF 0,7	
		Мин. Sx (v2.5) ¹	Мин. Sx (v2) ²	Макс. Sx (v2.5) ¹	Макс. Sx (v2) ²
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Вставки	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Делеции	35	100 %	> 99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

¹ Значения Sx основаны на оценочных показателях общего стандартного отклонения, полученных в результате анализа компоненты дисперсии.

² Значения Sx основаны на стандартных отклонениях образца.

Somatic

Прецизионность набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) при использовании с модулем Somatic Variant Module была оценена с использованием зафиксированных формалином и залитых парафином образцов Platinum Genome и репрезентативного анализа. Тестирование состояло из одной подготовки библиотеки с использованием набора TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, для чего было обработано два образца с восемью репликами для каждого. Библиотеки были секвенированы с помощью трех серий набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов) и трех приборов NextSeq 550Dx всего для девяти запусков секвенирования.

Для оценки вариабельности прибора рядом с пороговым значением VAF модуля Somatic Variant Module (соматические варианты с уровнем VAF $\geq 0,026$ называются положительными для данного варианта) использовали соматические варианты с ожидаемыми уровнями VAF $\leq 0,10$ (N = 131 уникальный вариант). Для каждого из соматических вариантов были определены значения C95. Значения C95 представляют величину VAF, при которой вероятность превышения порогового значения VAF модуля Somatic Variant Module составляет 95 %. Наивысшие значения C95 по типу варианта указаны в [Таблица: 34](#). Для справки приведены значения C95 из единственного запуска секвенирования с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов).

Таблица: 34 Краткие сведения о C95 при применении модуля Somatic

Тип варианта	Количество оцененных вариантов	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Вставки	24	0,062	0,061
Делеции	33	0,060	0,060

¹ Значения C95 основаны на оценочных показателях общего стандартного отклонения, полученных в результате анализа компоненты дисперсии.

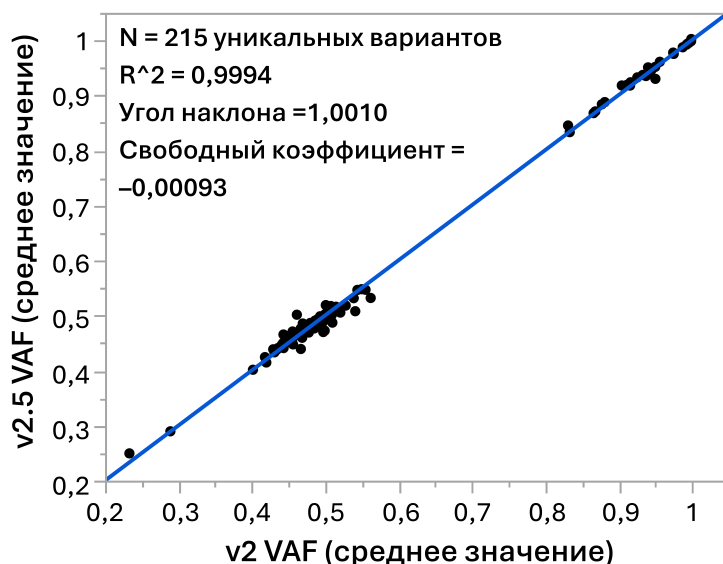
² Значения C95 основаны на стандартных отклонениях образца.

Сопоставление методов (набор реагентов)

Germline

Средние значения VAF от 215 уникальных вариантов оценивали с помощью набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов), используя результаты, сгенерированные с помощью модуля Germline Variant Module. Средние значения VAF рассчитывали на основании результатов 11 запусков секвенирования (v2.5) и одного запуска секвенирования (v2). Для расчета среднего значения для каждого варианта использовали не менее восьми повторностей. На графике [Рисунок 3](#) представлена корреляция VAF между двумя наборами реагентов. На основании сильной линейной корреляции VAF и подобию результатов применения наборов реагентов эксплуатационные характеристики, которые изначально были проверены и валидированы с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) с применением модуля Germline Variant Module, определены как применимые к набору NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов).

Рисунок 3 Корреляция частоты вариантных аллелей (VAF) для модуля Germline Variant Module между набором NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов).

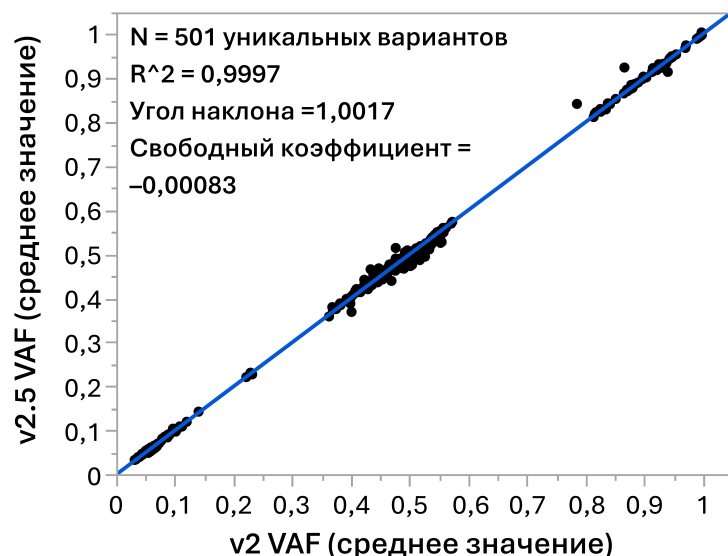


Somatic

Средние значения VAF от 501 уникального варианта оценивали с помощью набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов), используя результаты, сгенерированные с помощью модуля Somatic Variant Module. Средние значения VAF рассчитывали на основании результатов 11 запусков секвенирования (v2.5) и одного запуска секвенирования (v2). Для расчета среднего значения для каждого уникального варианта использовали по меньшей мере три повторности. На [Рисунок 4](#) представлена корреляция VAF между двумя наборами реагентов. На основании корреляции VAF и

подобия результатов применения наборов реагентов эксплуатационные характеристики, которые были проверены и валидированы с использованием набора NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) с применением модуля Somatic Variant Module, определены как применимые к набору NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов).

Рисунок 4 Корреляция частоты вариантных аллелей (VAF) для модуля Somatic Variant Module между набором NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 циклов) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклов).



История изменений

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000030326, версия 07	Август 2023 г.	Добавлено содержимое для поддержки дополнительного сервера Illumina DRAGEN для NextSeq 550Dx. Обновлен каталожный номер воздушного фильтра. Обновлен номер варианта FFPE (соматический), используемый для определения частоты вариантов аллелей. Обновлена таблица сводных данных согласованности зародышевой линии. Добавлено предупреждение об угрозах кибербезопасности.
Документ № 1000000030326, версия 06	Май 2022 г.	Внесены обновления для исправления контента, случайно добавленного из исходного программного обеспечения.

Документ	Дата	Описание изменений
Документ № 1000000030326, версия 05	Ноябрь 2021 г.	В раздел «Предупреждения и меры предосторожности» добавлен пункт, касающийся отчетности о серьезных инцидентах. В раздел «Принципы проведения процедуры» добавлен пункт, в котором указаны предполагаемые пользователи. Удалена ссылка на набор реагентов High Output Reagent Kit v2 (300 циклов). Добавлена ссылка на набор реагентов High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).
Документ № 1000000030326, версия 04	Август 2021 г.	Добавлена таблица «История изменений». Обновлен адрес уполномоченного представителя в ЕС.

Патенты и товарные знаки

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

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделий, описанных в настоящем документе. Перед началом работы с оборудованием пользователь обязан тщательно изучить данный документ.

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

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

© 2023 Illumina, Inc. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте www.illumina.com/company/legal.html.

Контактная информация



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

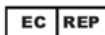
San Diego, California 92122 США

+1-800-809-ILMN (4566)

+1-858-202-4566 (за пределами Северной Америки)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



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

Спонсор в Австралии

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Австралия

Маркировка изделия

Полную информацию о символах, которые изображены на упаковке и этикетке изделия, см. в описании условных обозначений по адресу support.illumina.com на вкладке *Documentation* (Документация) для вашего набора.