

Navodila za uporabo

SAMO ZA IN VITRO DIAGNOSTIČNO UPORABO. SAMO ZA IZVOZ.

Kataloška št. 20005715

Predvidena uporaba

Instrument Instrument NextSeq 550Dx je namenjen sekvenciranju knjižnic DNK, kadar se uporabljajo z *in vitro* diagnostičnimi testi. Instrument Instrument NextSeq 550Dx je namenjen uporabi s specifičnimi registriranimi, certificiranimi ali odobrenimi reagenti za *in vitro* diagnostiko in z analitično programsko opremo.

Načela postopka

Instrument Illumina Instrument NextSeq 550Dx je namenjen sekvenciranju knjižnic DNK z *in vitro* diagnostičnimi testi in je predviden za uporabo s strani usposobljenega kliničnega laboratorijskega osebja, usposobljenega za uporabo *in vitro* diagnostičnih postopkov, izvajanih v kliničnem laboratoriju. Za svoj vnos NextSeq 550Dx uporablja knjižnice, ustvarjene iz DNK, kjer se vzorčni indeksi in zajete sekvence dodajo pomnoženim tarčam. Knjižnice vzorcev se zajamejo na pretočni celici in sekvencirajo na instrumentu z uporabo kemičnega postopka sekvenciranja po sintezi (SBS). Kemični postopek SBS uporablja metodo reverzibilnega terminatorja za zaznavanje fluorescenčno označenih posameznih nukleotidnih baz, ko so vključene v rastoče verige DNK. Programska oprema Real-Time Analysis (RTA) izvaja analizo slik in določanje baz ter vsaki bazi dodeli oceno kakovosti za vsak cikel sekvenciranja. Ko se primarna analiza konča, se lahko na instrumentu izvede sekundarna analiza za obdelavo določitev baz. NextSeq 550Dx uporablja različne module za sekundarno analizo, odvisno od poteka dela. Za modula Germline ali Somatic Variant obdelava vključuje demultipleksiranje, ustvarjanje datotek FASTQ, poravnavo, določanje variant in ustvarjanje datotek v obliki zapisa (VCF in gVCF) za določanje variant. Datoteke VCF in gVCF vsebujejo informacije o variantah, najdenih na določenih položajih v referenčnem genomu.

Konfiguracija dvojnega zagona

NextSeq 550Dx vključuje konfiguracijo dvojnega zagona, ki omogoča uporabo instrumenta v diagnostičnem (Dx) ali raziskovalnem načinu (RUO). Testi *in vitro* diagnostičnega sekvenciranja, vključno z moduloma Germline in Somatic Variant, se izvajajo v diagnostičnem načinu. V diagnostičnem načinu se lahko uporabljajo samo reagenti za IVD-sekvenciranje. Značilnosti delovanja in omejitve postopka za instrument NextSeq 550Dx so bile ugotovljene z uporabo modulov Germline in Somatic Variant v diagnostičnem načinu.

Omejitve postopka

1. Za *in vitro* diagnostično uporabo.
2. Modula Germline in Somatic Variant, kadar se uporabljata s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) ali NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov), imata zmogljivost za:
 - Odčitke sekvenciranja ≥ 90 gigabaz (Gb)
 - Dolžino odčitkov (obojestranske izvedbe) 2×150 baznih parov (bp)
 - Baze s Q30 ≥ 75 % ali več pri dolžini odčitkov 2×150 bp
Enako ali več kot 75 % baz ima ocene kakovosti Phred ≥ 30 , kar kaže na točnost določitve baze, večjo od 99,9 %.
3. Odčitkov z indeli (insercije, delecije ali kombinacije), pri katerih je dolžina vsebine > 25 bp, programska oprema za teste ne poravna. Zato indelov dolžine > 25 bp s programsko opremo za teste ni mogoče zaznati.
4. Programska oprema za teste morda ne bo poravnala odčitavanja amplicona z ekstremno vsebnostjo variant, zaradi česar se regija poroča kot divji tip. Takšna ekstremna vsebnost vključuje:
 - odčitke, ki vsebujejo več kot tri indele
 - odčitke z dolžino vsaj 30 bp z vsebnostjo variant posameznega nukleotida (SNV) > 4 % skupne tarčne dolžine amplicona (razen regij sonde)
 - odčitke z dolžino < 30 bp z vsebnostjo SNV > 10 % skupne dolžine amplicona (vključno z regijami sonde)
5. Velike različice, vključno z multinukleotidnimi variantami (MNV) in velikimi indeli, se lahko v izhodni datoteki VCF poročajo kot ločene manjše variante.
6. Delecijske variante se lahko filtrirajo ali spregledajo, kadar segajo čez dva prekrivajoča se amplicona, če je dolžina delecije večja ali enaka prekrivanju med njima.
7. Sistem ne more zaznati indelov, če se pojavijo neposredno ob začetniku in ni prekrivajočega se amplicona. Za regije s prekrivajočimi se ampliconi test ne more zaznati delecij, če je območje prekrivanja manjše od velikosti delecije, ki jo je treba zaznati. Na primer, če je regija prekrivanja med dvema sosednjima ampliconoma dve bazi, test ne more zaznati nobenih delecij, vključno z obema bazama. Zazna se lahko delecija ene baze katere koli od teh baz.
8. Tako kot pri vseh potekih dela priprave knjižnice, ki temeljijo na hibridizaciji, lahko osnovni polimorfizmi, mutacije, insercije ali delecije v regijah, ki vežejo oligonukleotid, vplivajo na alele, ki se sondirajo, in na določitve, ki se izvajajo med sekvenciranjem. Na primer:
 - Varianta, ki je v fazi z varianto v regiji začetnika, morda ne bo pomnožena, kar bo povzročilo lažno negativen rezultat.
 - Variante v regiji začetnega oligonukleotida lahko preprečijo pomnoževanje referenčnega alela, kar ima za posledico nepravilo homozigotno določitev variante.
 - Indel variante v regiji začetnega oligonukleotida lahko povzročijo lažno pozitivno določitev na koncu odčitka, ki meji na začetni oligonukleotid.

9. Indeli se lahko filtrirajo zaradi pristranskosti verige, če se nahajajo blizu konca enega odčitka in so med poravnavo mehko izrezani („soft-clipped“).
10. Majhni MNV-ji niso bili validirani in jih sporoči samo modul Somatic Variant.
11. Delecije so v datoteki VCF poročane na koordinatnem območju predhodne baze glede na format VCF. Zato razmislite o sosednjih različicah, preden poročate, da je posamezna določitev baze homozigotna referenca.
12. Omejitve, specifične za zarodne linije:
 - Instrument NextSeq 550Dx, z uporabo modula Germline Variant Local Run Manager za NextSeq 550Dx, je zasnovan tako, da zagotavlja kvalitativne rezultate za določanje variant zarodne linije (npr. homozigotno, heterozigotno, divji tip).
 - Pri uporabi z modulom Germline Variant je najmanjša pokritost na ampikon, potrebna za natančno določitev variante, 150 ×. Zato je potrebnih 150 podpornih fragmentov DNK, kar je enakovredno 300 prekrivajočim odčitkom z obeh koncev. Na pokritost vplivata število vzorcev in skupno število tarčnih baz. Na pokritost lahko vplivata vsebnost GC in druga genomska sestava.
 - Sprememba števila kopij lahko vpliva na to, ali je varianta opredeljena kot homozigotna ali heterozigotna.
 - Variante v določenem ponavljajočem se kontekstu so v datotekah VCF izločene. Filter RMxN ponovitev se uporablja za filtriranje variant, če je celotna sekvenca variante ali njen del večkrat prisoten v referenčnem genomu, ki meji na položaj variante. Za določanje variant zarodne linije je potrebnih vsaj devet ponovitev v referenci, da se varianta filtrira. Upoštevajo se samo ponovitve z dolžino do 5 bp (R5x9).
 - Indel in SNV na enem samem lokusu lahko povzročita, da je poročana samo ena varianta.
13. Somatsko specifične omejitve.
 - Instrument NextSeq 550Dx, z uporabo modula Somatic Variant Local Run Manager za NextSeq 550Dx, je zasnovan tako, da zagotavlja kvalitativne rezultate za določanje somatskih variant (npr. prisotnost somatske variante z variantno frekvenco, večjo ali enako 0,026 z mejo zaznavanja 0,05).
 - Pri uporabi z modulom Somatic Variant je najmanjša pokritost na ampikon, potrebna za natančno določitev variante, 450 × na zbirke oligonukleotidov. Zato je potrebnih 450 podpornih fragmentov DNK na zbirke oligonukleotidov, kar je enakovredno 900 prekrivajočim odčitkom z obeh koncev. Na pokritost vplivata število vzorcev in skupno število tarčnih baz. Na pokritost lahko vplivata vsebnost GC in druga genomska sestava.
 - Za določanje somatskih variant je potrebnih vsaj šest ponovitev v referenci, da se varianta filtrira, in se upoštevajo samo ponovitve z dolžino do 3 bp (R3x6).
 - Modul Somatic Variant ne more razlikovati med zarodnimi in somatskimi variantami. Modul je zasnovan za zaznavanje variant z različnimi frekvencami variant, vendar frekvence variant ni mogoče uporabiti za razlikovanje somatskih variant od variant zarodne linije.
 - Normalno tkivo v vzorcu vpliva na zaznavanje variant. Poročana meja zaznavnosti temelji na pogostnosti različice glede na celokupno DNK, pridobljeno tako iz tumorja kot tudi iz normalnega tkiva.

Sestavni deli izdelka

Illumina NextSeq 550Dx sestavljajo:

1. Instrument NextSeq 550Dx (katalogska št. 20005715)
2. Komponente programske opreme za Instrument NextSeq 550Dx vključujejo naslednje:

Aplikacija programske opreme	Funkcija	Opis
Operacijska programska oprema (NOS) NextSeq 550Dx	Nadzoruje delovanje instrumenta	Aplikacija programske opreme NOS upravlja delovanje instrumenta med sekvenciranjem in ustvarja slike za uporabo s programsko opremo Real-Time Analysis (RTA).
Programska oprema Real-Time Analysis (RTA)	Izvaja primarno analizo	Aplikacija programske opreme RTA pretvori slike, ki jih ustvari NOS za vsako ploščico na cikel izvedbe sekvenciranja, v datoteke določitve baze, ki so vhod za module za analizo Local Run Manager. Aplikacija programske opreme RTA ne vsebuje uporabniškega vmesnika.
Local Run Manager	Vmesnik za izbiro modula	Programska oprema Local Run Manager je integrirana rešitev na instrumentu za upravljanje uporabnikov, izbiro ustreznega modula za analizo in spremljanje stanja.
Modul Somatic Variant	Izvaja sekundarno analizo	Ta programska oprema modula za analizo Local Run Manager obdeluje določitve baz s sekundarno analizo. Obdelava vključuje demultipleksiranje, ustvarjanje datotek FASTQ, poravnavo, določanje variant in poročanje. Orodje za določanje variant (Pisces) ustvari datoteke VCF, ki vsebujejo informacije o variantah, najdenih na določenih položajih v referenčnem genomu, in vključuje izmerjeno variantno frekvenco.
Modul Germline Variant	Izvaja sekundarno analizo	Ta programska oprema modula za analizo Local Run Manager obdeluje določitve baz s sekundarno analizo. Obdelava vključuje demultipleksiranje, ustvarjanje datotek FASTQ, poravnavo, določanje variant in poročanje. Orodje za določanje variant (Pisces) ustvari datoteke VCF, ki vsebujejo informacije o variantah, najdenih na določenih položajih v referenčnem genomu in vsako varianto identificira kot heterozigotno ali homozigotno.

3. **Izbirno** Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx (katalogska št. 20086130), vključno z naslednjo komponento programske opreme:

Aplikacija programske opreme	Funkcija	Opis
Illumina Run Manager	Vmesnik za izbiro aplikacijskega modula	Programska oprema Illumina Run Manager je nameščena na izbirnem strežniku DRAGEN, ki je izven instrumenta. Illumina Run Manager omogoča upravljanje uporabnikov, izbiro modula za analizo in spremljanje izvedbe sekvenciranja ter stanja analize.

Izbirni strežnik Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx je na voljo samo v izbranih državah. Za regionalno razpoložljivost se obrnite na predstavnika družbe Illumina.

Pogoji delovanja

Za več informacij o pogojih delovanja glejte razdelek Okoljski dejavniki v *navodilih za pripravo mesta za instrument NextSeq 550Dx (dokument št. 1000000009869)*.

Element	Specifikacija
Temperatura	Temperatura v laboratoriju mora biti ves čas od 19 °C do 25 °C (22 °C ± 3 °C). To je delovna temperatura instrumenta. Med sekvenciranjem ne dovolite, da se temperatura okolja spremeni za več kot ± 2 °C.
Vlažnost	Ohranjajte nekondenzirajočo relativno vlažnost v vrednosti od 20 % do 80 %.

Oprema in materiali

Potrebna oprema in materiali, ki se prodajajo ločeno

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciklov), kataloška št. 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov), kataloška št. 20028871

Potrebna oprema in materiali, ki niso priloženi

Potrošni material za izvedbe sekvenciranja, ki jih priskrbi uporabnik

Potrošni material	Dobavitelj	Namen
Zloženci, prepojeni s 70-odstotnim izopropilnim alkoholom ali etanol, 70 %	VWR, katalogška št. 95041-714 (ali enakovredno) Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Čiščenje pretočne celice in splošni namen
Čistilna krpa, ki ne pušča nitk	VWR, katalogška št. 21905-026 (ali enakovredno)	Čiščenje pretočne celice in splošni namen

Potrošni material za vzdrževanje instrumenta, ki jih priskrbi uporabnik

Potrošni material	Dobavitelj	Namen
NaOCl, 5 % (natrijev hipoklorit)	Sigma-Aldrich, katalogška št. 239305 (ali enakovreden laboratorijski)	Pranje instrumenta z ročnim pranjem po izvedbi; razredčen na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalogška št. P7949	Pranje instrumenta z možnostmi ročnega pranja; razredčen na 0,05 %
Voda, laboratorijska	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Pranje instrumenta (ročno pranje)
Zračni filter	Illumina, katalogška št. 20063988	Čiščenje zraka, ki ga instrument zajema za hlajenje

Smernice za laboratorijsko vodo

Za izvajanje postopkov na instrumentu vedno uporabljajte laboratorijsko vodo ali deionizirano vodo. Nikoli ne uporabljajte vode iz pipe. Uporabljajte le naslednje razrede vode ali njihove ekvivalente:

- Deionizirana voda
- Illumina PW1
- Voda z upornostjo 18 megohmov (MΩ)
- Voda Milli-Q
- Voda Super-Q
- Voda za molekularno biologijo

Opozorila in previdnostni ukrepi



POZOR

Zvezna zakonodaja ZDA omejuje prodajo tega pripomočka s strani ali po naročilu zdravnika, ki je licenciran po zakonodaji države, v kateri deluje, za uporabo ali naročanje uporabe pripomočka.

1. **Nekatere komponente reagentov, ki jih zagotavlja Illumina za uporabo s sistemom Instrument NextSeq 550Dx, vsebujejo potencialno nevarne kemikalije. Zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi lahko pride do telesnih poškodb. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte varnostne liste (SDS) na spletnem mestu support.illumina.com/sds.html.**
2. O resnih zapletih, povezanih s tem izdelkom, takoj poročajte družbi Illumina in pristojnim organom držav članic, v katerih prebivata uporabnik in bolnik.
3. Z vsemi vzorci krvi ravnajte, kot da so znani povzročitelji okužbe z virusom humane imunske pomanjkljivosti (HIV), virusom humanega hepatitisa B (HBV) in drugimi patogeni, ki se prenašajo s krvjo (univerzalni previdnostni ukrepi).
4. Neupoštevanje opisanih postopkov lahko povzroči napačne rezultate oziroma znatno zmanjšanje kakovosti vzorca.
5. Uporabljajte rutinske laboratorijske previdnostne ukrepe. Ne pipetirajte z usti. Ne jejte, pijte ali kadite na določenih delovnih območjih. Pri ravnanju z vzorci in reagenti v kompletu nosite rokavice za enkratno uporabo in laboratorijske plašče. Po ravnanju z vzorci in reagenti v kompletu si temeljito umijte roke.
6. Da produkti PCR ne bi kontaminirali reagentov, instrumentov in vzorcev genomske DNK, so potrebne ustrezne laboratorijske prakse in dobra laboratorijska higiena. Kontaminacija PCR lahko povzroči netočne in nezanesljive rezultate.
7. Da bi preprečili kontaminacijo, zagotovite, da imajo območja pred pomnoževanjem in po pomnoževanju namensko opremo in potrošni material (npr. pipete, nastavke za pipete, toplotne bloke, vibracijske mešalnike in centrifuge).
8. Povezovanje indeksa z vzorcem se mora natančno ujemati s postavitvijo natisnjene plošče. Local Run Manager samodejno izpolni indeksne začetne oligonukleotide, povezane z imeni vzorcev, ko so vneseni v modul. Uporabniku svetujemo, da pred zagonom izvedbe sekvenciranja preveri, da so začetni oligonukleotidi za indeksiranje povezani z vzorci. Neskladja med vzorcem in postavitvijo ploščice povzročijo izgubo pozitivne identifikacije vzorca in nepravilno poročanje o rezultatih.
9. Namestitev protivirusne programske opreme, ki jo priskrbi uporabnik, je zelo priporočljiva za zaščito računalnika pred virusi. Za navodila o namestitvi glejte uporabniški priročnik.
10. Ne uporabljajte NextSeq 550Dx, če je katera koli od plošč odstranjena. Če instrument uporabljate, ko je katera koli od plošč odstranjena, boste morda izpostavljeni omrežni in enosmerni napetosti.

11. Ne dotikajte se platforme pretočne celice v razdelku za pretočne celice. Grelnik v tem razdelku deluje med 22 °C in 95 °C in lahko povzroči opekline.
12. Instrument tehta približno 84 kg (185 funtov) in lahko povzroči hude telesne poškodbe, če pade ali se z njim slabo rokuje.

Navodila za uporabo

Naslednja navodila za uporabo Instrument NextSeq 550Dx zahtevajo reagente, zagotovljene v kompletu reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) ali NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciklov).

Ustvarjanje izvedbe

Ustvarite izvedbo sekvenciranja z uporabo Local Run Manager ali Illumina Run Manager. Navodila za uporabo Local Run Manager so vključena spodaj in v Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513). Za navodila o tem, kako ustvariti izvedbo z uporabo Illumina Run Manager, glejte Navodila za programsko opremo Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (dokument št. 200025239).

Za navodila o izbiri med Local Run Manager in Illumina Run Manager glejte Navodila za programsko opremo Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (dokument št. 200025239). Za podrobna navodila o posameznih aplikacijah glejte navodila za modul oziroma aplikacijo za določen test.

Naslednja navodila se nanašajo na uporabo modulov Germline in Somatic Variant Local Run Manager.

Nastavitev parametrov

1. Prijavite se v Local Run Manager.
2. Izberite **Create Run** (Ustvari izvedbo) in izberite **Somatic Variant** (Somatska varianta) ali **Germline Variant** (Varianta zarodne linije).
3. Vnesite ime izvedbe, ki označuje izvedbo od sekvenciranja do končane analize.
Uporabite alfanumerične znake, presledke, podčrtaje ali pomišljaje.
4. [Izbirno] Vnesite opis izvedbe kot pomoč za opredelitev izvedbe.
Uporabite alfanumerične znake, presledke, podčrtaje ali pomišljaje.
5. Na spustnem seznamu izberite število vzorcev in nabor indeksov.
Pri izbiri upoštevajte naslednje informacije.
 - Na spustnem seznamu je število vzorcev z naborom indeksov. Na primer, 24-Set 1 označuje 24 vzorcev, ki jih je treba testirati, z indeksi iz indeksnega nabora 1.
 - Številke nabora indeksov se nanašajo na različne nabore indeksnih parov i5 in i7. Nabor 1 in nabor 2 zagotavljata raznolikost indeksov. Na voljo sta dva nabora indeksov, ki pomagata preprečiti deplecijo enega nabora.

- Izberite število vzorcev, ki je najbližje številu vzorcev, ki jih testirate. Če natančnega števila vzorcev ni na seznamu, izberite najbližjo številko, vendar manj od števila, ki jih testirate. Če želite na primer testirati 18 vzorcev, izberite 16 vzorcev.
- Predlagane vdolbinice za vzorec in kombinacije indeksov, ki izpolnjujejo zahteve za raznolikost indeksov, so označene z zeleno barvo.

Uvoz manifestnih datotek za izvedbo

1. Prepričajte se, da so manifesti, ki jih želite uvoziti, na voljo na dostopnem omrežnem mestu ali na pogonu USB.
2. Izberite **Import Manifests** (Uvozi manifeste).
3. Pomaknite se do manifestne datoteke in izberite manifeste, ki jih želite dodati.

OPOMBA Če želite, da so manifestne datoteke na voljo za vse izvedbe z modulom za analizo Germline Variant ali Somatic Variant, dodajte manifeste s funkcijo Module Settings (Nastavitve modula). Ta funkcija zahteva dovoljenja za raven skrbnika. Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.

Določitev vzorcev za izvedbo

Vzorke za izvedbo določite z eno od možnosti in navodili, ki sledijo.

Ročni vnos vzorcev – na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo) uporabite prazno tabelo.

Uvoz vzorcev – pomaknite se v zunanjo datoteko v formatu z vrednostmi, ločenimi z vejicami (*.csv). Predloga je na voljo za prenos na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo).

Ročni vnos vzorcev

1. Vnesite enolično ime vzorca (*modul za analizo Somatic Variant*) ali ID vzorca (*modul za analizo Germline Variant*).
Uporabite alfanumerične znake, pomišljaje ali podčrtaje.
2. [Izbirno] Za pozitivne ali negativne kontrolne vzorce kliknite desno tipko miške in izberite vrsto kontrole. Kontrola v eni vzorčni vdolbinici samodejno napolni ustrezno vdolbinico v drugem zbiru z isto kontrolo.
3. [Izbirno] V polje Sample Description (Opis vzorca) vnesite opis vzorca.
Uporabite alfanumerične znake, pomišljaje ali podčrtaje.
4. Izberite adapter indeksa 1 s spustnega seznama Index 1 (i7).
Ko uporabljate predlagane vzorčne vdolbinice, programska oprema samodejno napolni adapterje indeksa i7 in i5, ki izpolnjujejo zahteve za raznolikost indeksa. Če na seznamu ni natančnega števila vzorcev, ki jih testirate, izberite indeksne adapterje za dodatne vdolbinice.
5. Izberite Index 2 adapter (Adapter indeksa 2) s spustnega seznama Index 2 (i5) (Indeks 2 (i5)).

- Izberite manifestno datoteko s spustnega seznama Manifest.
Vzorci v zbirku A zahtevajo drugačen manifest kot vzorci v zbirku B.
- Izberite možnost, da si ogledate, natisnete ali shranite postavitev ploščice kot referenco za pripravo knjižnic:
 - Izberite ikono  **Print** (Natisni), da se prikaže postavitev ploščice. Izberite **Print** (Natisni) za tiskanje postavitve ploščice.
 - Izberite **Export** (Izvoz) za izvoz podatkov o vzorcu v zunanjo datoteko.
- Izberite **Save Run** (Shrani izvedbo).

Uvoz vzorcev

- Izberite **Import Samples** (Uvoz vzorcev) in poiščite mesto datoteke CSV. Obstajata dve vrsti datotek, ki jih lahko uvozite.
 - Izberite **Template** (Predloga) na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo), da ustvarite novo postavitev ploščice. Datoteka predloge vsebuje pravilne naslove stolpcev za uvoz. Vnesite informacije o vzorcu v vsak stolpec za vzorce v izvedbi. Izbršite podatke v neuporabljenih celicah in nato shranite datoteko.
 - Uporabite datoteko z informacijami o vzorcih, ki ste jo izvozili iz modula Germline Variant ali Somatic Variant s funkcijo Export (Izvoz).
- Izberite ikono  **Print** (Natisni), da se prikaže postavitev ploščice.
- Izberite **Print** (Natisni), da natisnete postavitev ploščice kot referenco za pripravo knjižnic.
- Izberite **Save Run** (Shrani izvedbo).

Priprava kartuše z reagenti

Za uspešno sekvenciranje natančno upoštevajte navodila za kartušo z reagenti.

- Kartušo z reagenti prestavite s temperature -25°C na temperaturo -15°C .
- Izberite eno od naslednjih metod za odtajanje reagentov. Ne potaplajte kartuše. Kartušo po odtajanju osušite, preden nadaljujete z naslednjim korakom.

Temperatura	Čas za odtajanje	Omejitev stabilnosti
Vodna kopel med 15°C in 30°C	60 minut	Ne prekoračite 6 ur
od 2°C do 8°C	7 ur	Ne prekoračite 5 dni

OPOMBA Če se v isti vodni kopeli odtaja več kot ena kartuša, omogočite dodaten čas odtajanja.

- Kartušo petkrat obrnite, da se reagenti premešajo.
- Preglejte dno kartuše in se prepričajte, da so reagenti odtajani in brez oborin. Prepričajte se, da so položaji 29, 30, 31 in 32 odtaljeni, saj so največji in se najdlje odtajujejo.
- Nežno potrkajte s kartušo po mizi, da zmanjšate možnost zračnih mehurčkov.

Za najboljše rezultate nadaljujte neposredno z vstavljanjem vzorca in nastavitvijo izvedbe.

Priprava pretočne celice

1. Škatlo z novo pretočno celico vzemite iz hladilnika, kjer je bila shranjena (pri temperaturi med 2 °C in 8 °C).
2. Odstranite embalažno folijo s škatle in jo 30 minut pustite stati pri sobni temperaturi.

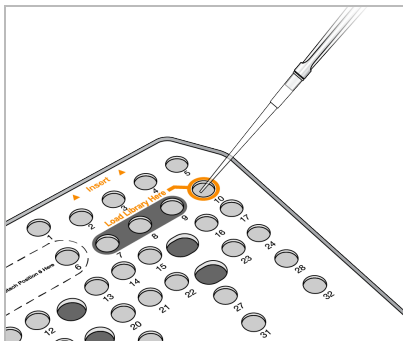
Priprava knjižnic za sekvenciranje

Denaturirajte in razredčite svoje knjižnice na volumen ob vstavljanju 1,3 ml. V praksi se lahko koncentracija ob vstavljanju razlikuje glede na pripravo knjižnice in metodo kvantifikacije. Redčenje knjižnic vzorcev je odvisno od kompleksnosti oligonukleotidnih zbirkov. Za navodila o pripravi knjižnic vzorcev za sekvenciranje, vključno z redčenjem knjižnic in združevanjem, glejte razdelke Navodila za uporabo za uporabo za ustrezen komplet za pripravo knjižnice. Potrebna je optimizacija gostote gruče na NextSeq 550Dx.

Vstavljanje knjižnic v kartušo z reagenti

1. S krpico, ki ne pušča vlaken, očistite tesnilno folijo, ki pokriva rezervoar št. 10 z oznako **Load Library Here** (Vstavi knjižnico tukaj).
2. Tesnilo prebodite s čisto konico 1-mililitrske pipete.
3. Vstavite 1,3 ml pripravljenih knjižnic v rezervoar št. 10 z oznako **Load Library Here** (Vstavite knjižnico tukaj). Pri odmerjanju knjižnic pazite, da se ne dotaknete zaščitne folije.

Slika 1 Vstavljanje knjižnic



Nastavljanje izvedbe sekvenciranja

Za celotna navodila za nastavljanje izvedbe glejte Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513).

1. Prijavite se v NextSeq 550Dx z geslom za programsko opremo Local Run Manager ali Illumina Run Manager.
2. Na zaslonu Home (Začetna stran) programske opreme NOS izberite **Sequence** (Sekvenciraj).
3. Izberite izvedbo s seznama in nato izberite **Next** (Naprej).

Serija zaslonov za nastavitve izvedbe se odpira v naslednjem vrstnem redu: Load Flow Cell (Vstavljanje pretočne celice), Load Buffer Cartridge (Vstavljanje kartuše s pufrom), Load Reagent Cartridge (Vstavljanje kartuše z reagenti) in Pre-run Check (Preverjanje pred izvedbo).

OPOMBA Izvedbe so dostopne samo z isto programsko opremo Run Manager, ki je bila uporabljena pri načrtovanju izvedbe. Za navodila, kako nastaviti programsko opremo Run Manager, glejte Navodila za programsko opremo Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx (dokument št. 200025239).

4. Ko se prikaže zaslon Load Flow Cell (Vstavljanje pretočne celice), očistite in nato vstavite pretočno celico.
 - Vzemite pretočno celico iz embalažne folije.
 - Odprite prozorno plastično škatlo na preklap in odstranite pretočno celico
 - Stekleno površino pretočne celice očistite z alkoholnim robčkom, ki ne pušča vlaken. Osušite steklo s čistilno krpo, ki ne pušča nitk
 - Prepričajte se, da je steklena površina pretočne celice čista. Po potrebi ponovite postopek čiščenja.
 - Odstranite rabljeno pretočno celico iz prejšnje izvedbe.
 - Poravnajte pretočno celico preko zatičev za poravnavo in jo postavite na platformo.
5. Izberite **Load** (Vstavi).

Vrata se samodejno zaprejo, na zaslonu se prikaže ID pretočne celice in preverijo se senzorji.
6. Sledite pozivom programske opreme, da izpraznite posodo z rabljenimi reagenti, vstavite kartušo s pufrom NextSeq 550Dx in vstavite kartušo z reagenti NextSeq 550Dx.

Ko vstavite kartušo s pufrom in reagenti NextSeq 550Dx, programska oprema prebere in zabeleži RFID. Na zaslonu se prikažeta ID-ja kartuš s pufrom in z reagentom, senzorji pa se preverijo.
7. Ko je samodejno preverjanje pred izvedbo končano, izberite **Start** (Zaženi). (Ni potrebno, če je konfigurirano za samodejni zagon).
8. Ko se izvedba začne, se odpre zaslon Sequencing (Sekvenciranje). Ta zaslon nudi vizualno predstavitev poteka izvedbe, vključno z intenzitetami in ocenami kakovosti (ocene Q).

Rezultati

Real-Time Analysis (RTA) je vgrajena programska oprema, ki izvaja analizo slik in določitev baz ter vsaki bazi dodeli oceno kakovosti za vsak cikel sekvenciranja. Ko se primarna analiza konča, izbrani aplikacijski modul samodejno začne sekundarno analizo. Postopki sekundarne analize, opisani tukaj, so za modula za Germline Variant in Somatic Variant Local Run Manager na Instrument NextSeq 550Dx.

Demultipleksiranje

Demultipleksiranje primerja vsako sekvenco indeksnega odčitavanja z indeksnimi sekvencami, določenimi za izvedbo. V tem koraku se ne upoštevajo nobene vrednosti kakovosti.

Indeksni odčitki so označeni po naslednjih korakih:

- Vzorci so oštevilčeni z začetkom od 1 na podlagi vrstnega reda, v katerem so navedeni za izvedbo.
- Številka vzorca 0 je rezervirana za gruče, ki niso bile dodeljene vzorcu.
- Gruče so dodeljene vzorcu, ko se sekvenca indeksov točno ujema ali ko je na voljo največ eno neujemanje na indeksno odčitavanje.

Ustvarjanje datoteke FASTQ

Po demultipleksiranju programska oprema ustvari datoteke vmesne analize v obliki zapisa FASTQ, ki je besedilna oblika, uporabljena za predstavitev zaporedij. Datoteke FASTQ vsebujejo odčitke za vsak vzorec in povezane ocene kakovosti. Gruče, ki niso prešle skozi filter, so izključene.

Vsaka datoteka FASTQ vsebuje odčitke samo za en vzorec, ime tega vzorca pa je vključeno v ime datoteke FASTQ. V modulih Germline in Somatic Variant se ustvari osem datotek FASTQ na vzorec na oligo pool, štiri iz odčitavanja 1 in štiri iz odčitavanja 2. Rezultat tega je skupno 8 in 16 datotek FASTQ na vzorec ločeno za zarodni in somatski potek dela. Datoteke FASTQ so primarni vhod za poravnavo.

Poravnava

Med korakom poravnave vezani algoritem Smith-Waterman poravna gruče iz vsakega vzorca z sekvencami amplicona, določenimi v manifestni datoteki.

Vezani algoritem Smith-Waterman izvaja polglobalne poravnave sekvenc, da določi podobne regije med dvema sekvencama. Namesto primerjanja celotne sekvence algoritem Smith-Waterman primerja segmente vseh mogočih dolžin.

Vsako odčitavanje z obeh koncev se oceni glede na njegovo poravnavo z ustreznimi sekvencami sond za to odčitavanje.

- Odčitek 1 se oceni glede na protismerni komplement navzdolnjih za lokus specifičnih oligonukleotidov (Downstream Locus-Specific Oligos – DLSO).
- Odčitek 2 se oceni glede na navzgorne za lokus specifične oligonukleotide (Upstream Locus-Specific Oligos – ULSO).
- Če se začetek odčitka ujema s sekvenco sonde z največ enim neujemanjem, je celotna dolžina odčitka poravnana s tarčo amplicona za to sekvenco.
- Če se začetek odčitka ujema s sekvenco sonde z največ tremi razlikami (neujemanja ali zamiki zaradi vodilnih indelov), je celotna dolžina odčitka poravnana s tarčo amplicona za to sekvenco.
- Indelov znotraj DLSO in ULSO zaradi kemije testa ne opazimo.

Poravnave se filtrirajo iz rezultatov poravnave na podlagi deležev neujemanja v regiji zanimanja ali polnem ampliconu, odvisno od dolžine amplicona. Filtrirane poravnave so zapisane v datotekah poravnave kot neporavnane in se ne uporabljajo v določanju variant.

Določanje variant

Orodje za določanje variant Pisces je zasnovano za pripravo določitev variant SNV in indelov iz knjižnic za instrument.

Poročila in dodatne izhodne datoteke

Moduli za analizo variant ustvarijo poročila obliki PDF in zapisa, ločenega s tabulatorji (*.txt), ki prikazujejo metrike, kot so globina sekvenciranja in število variant. Moduli ustvarijo tudi izhodne datoteke, kot so datoteke VCF in datoteke v obliki zapisa za določanje variant genoma (gVCF) za aplikacije določanja variant.

Postopki nadzora kakovosti

Programska oprema NextSeq 550Dx oceni vsako izvedbo, vzorec in določitev baze glede na metrike nadzora kakovosti. Pozitivne in negativne kontrole so priporočene tudi pri pripravi knjižnice in jih je treba oceniti. Kontrole ocenite na naslednji način.

- **Negativna kontrola (kontrola brez predloge) ali druga negativna kontrola** – ustvariti mora pričakovani rezultat. Če negativna kontrola ustvari rezultat, ki se razlikuje od pričakovanega, je prišlo do morebitne napake pri sledenju vzorcev, napačnega zapisovanja indeksnih začetnih oligonukleotidov ali kontaminacije.
- **Pozitivni kontrolni vzorec** – ustvariti mora pričakovani rezultat. Če pozitivna kontrola ustvari rezultat, ki se razlikuje od pričakovanega, je prišlo do morebitne napake pri sledenju vzorcev ali napačnega zapisovanja indeksnih začetnih oligonukleotidov.

Značilnosti učinkovitosti

Značilnosti učinkovitosti za Instrument NextSeq 550Dx so bile ugotovljene z uporabo modulov Germline in Somatic Variant z TruSeq Custom Amplicon Kit Dx in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in potrjene z uporabo NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Študije so vključevale indeksiranje vzorcev, prenos vzorcev, vnos DNK, analitično občutljivost (meja slepega/meja zaznavnosti), točnost, natančnost, primerjavo metod in ponovljivost.

Analitične študije, v katerih so uporabljali komplet reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov), so bile zasnovane za oceno trditev za učinkovitost, ki so bile predhodno določene s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). Rezultati kažejo, da imata kompleta reagentov (v2 in v2.5) primerljivo učinkovitost ob uporabi TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Za značilnosti učinkovitosti, povezane s predanalitičnimi dejavniki, kot so metode ekstrakcije ali moteče snovi, glejte *navodila za uporabo TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Opredelitve izračunov, ki se uporabljajo v značilnostih učinkovitosti

1. Odstotek pozitivnega ujemanja (PPA) se izračuna kot delež lokusov, ki jih je referenčna metoda razvrstila kot variante, za katere test pravilno poroča.
 - $(\text{št. lokusov variant, za katere test pravilno poroča}) / (\text{skupno št. lokusov variant})$
Lokusi variante, za katere poroča test, da so skladni z referenčno metodo, so pravi pozitivni (TP-ji).
Lokusi variante, za katere test poroča, da so referenčne določitve oziroma določitve drugačne variante, so lažno negativni (FN-ji).
2. Odstotek negativnega ujemanja (NPA) se izračuna kot delež lokusov, ki jih je referenčna metoda razvrstila kot divji tip, za katere test pravilno poroča.
 - $(\text{št. lokusov divjega tipa, za katere test pravilno poroča}) / (\text{skupno št. lokusov divjega tipa})$
Lokusi divjega tipa, za katere test poroča, da so skladni z referenčno metodo, so pravi negativni (TN-ji).
Lokusi divjega tipa, za katere test poroča, da so variante, so lažno pozitivni (FP-ji).
3. Odstotek skupnega ujemanja (OPA) se izračuna kot delež lokusov, za katerega je test pravilno poročal glede na referenčno metodo.
 - $((\text{št. lokusov variante, za katere je test pravilno poročal}) + (\text{št. lokusov divjega tipa, za katere je test pravilno poročal})) / ((\text{skupno št. lokusov variante}) + (\text{skupno št. lokusov divjega tipa}))$
4. Izračuni PPA, NPA in OPA ne vključujejo primerov brez določitve (lokusov variante ali reference, ki ne izpolnjujejo enega ali več filtrov kakovosti).
5. Delež avtosomnih določitev se izračuna kot skupno število lokusov, ki so prešli skozi filtre, deljeno s skupnim številom položajev, sekvenciranih za kromosome 1–22. Kromosoma X in Y sta izvzeta. Ta metrika ne upošteva ujemanja določitev z referenčno metodo.

Učinkovitost kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov)

Indeksiranje vzorca

Začetni oligonukleotidi indeksov vzorcev, dodani med pripravo knjižnice, vsakemu vzorcu DNK dodelijo edinstveno zaporedje. Ta edinstvena zaporedja omogočajo združevanje več vzorcev skupaj v eno izvedbo sekvenciranja. Indeksiranje vzorcev se uporablja za zarodne in somatske poteke dela. Namen te študije je bil določiti najmanjše (8) in največje (96) število vzorcev, ki jih je mogoče obdelati z eno izvedbo sekvenciranja na Instrument NextSeq 550Dx. Osem enoličnih vzorcev Platinum Genome so testirali z 12 različnimi kombinacijami začetnikov za indeksiranje na vzorec. Rezultate vzorcev iz štirih izvedb sekvenciranja z uporabo modula Germline Variant so primerjali s Platinum Genomes različice 2016-1.0.

Za prvi niz izvedb je bilo testiranih 96 enolično indeksiranih knjižnic vzorcev z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedbo po različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz na verigo v vseh 23 človeških kromosomih, da bi preverili sposobnost testa, da dosledno opravi genotipsko določanje za določeni vzorec z različnimi kombinacijami začetnikov za indeksiranje. Za drugi niz izvedb je bilo osem enolično indeksiranih knjižnic vzorcev sekvenciranih v dveh izvedbah sekvenciranja, da bi preverili najmanjše število podprtih indeksov.

Za izvedbe s 96 indeksi je bil razpon PPA za SNV-je od 98,7 % do 100 %, PPA za insercije in delecije je bil 100 % in NPA je bil 100 % za vsako izmed 96 kombinacij indeksov. 8-indeksne izvedbe so imele vrednosti PPA 100 % (SNV-ji, insercije in delecije) in NPA 100 % za vsako od osmih kombinacij indeksov.

Prenos vzorca

Instrument NextSeq 550Dx omogoča sekvenciranje več vzorcev in kontrol v eni izvedbi sekvenciranja. Izvedena je bila študija za oceno obsega prenosa vzorca med izvedbo sekvenciranja (v okviru izvedbe) in med več izvedbami sekvenciranja (iz izvedbe v izvedbo). Dva vzorca Platinum Genome, en moški in en ženski, sta bila testirana z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedovanje o različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz (150 amplikonov) v 23 različnih kromosomih, vključno z obema spolnima kromosomoma. Knjižnice so bile sekvencirane na instrumentu NextSeq 550Dx z modulom Germline Variant. Prenos moških vzorcev v ženske vzorce je bilo opažen s prisotnostjo odčitkov amplikonov kromosomov Y v ženskih vzorcih.

Do prenosa znotraj izvedbe lahko pride med ustvarjanjem gruč, indeksnim ciklom določanja baz in demultipleksiranjem vzorcev. Za testiranje prenosa vzorca v okviru izvedbe sekvenciranja je bil enkrat na instrumentu NextSeq 550Dx sekvenciran knjižnični zbirnik, sestavljen iz 46 replikatov vsakega moškega in ženskega vzorca ter štirih kontrol brez predloge. Prenos vzorca v okviru izvedbe je bil ocenjen s primerjavo pokritosti amplikona kromosoma Y vsakega ženskega replikata s povprečno pokritostjo amplikona kromosoma Y vseh moških replikatov v zbirku. Mediana opaženega prenosa v okviru izvedbe je bila 0,084 %.

Za preverjanje prenosov vzorcev med posameznimi izvedbami sta bila pripravljena dva knjižnična zbirka in sekvencirana zaporedoma na enem instrumentu NextSeq 550Dx. Prvi zbirnik je vseboval 46 replikatov ženskega vzorca in dve kontroli brez predloge. Drugi zbirnik je vseboval 46 replikatov moškega vzorca in dve kontroli brez predloge. Oba zbirka sta uporabljala enak nabor indeksnih adapterjev. Najprej je bil sekvenciran ženski zbirnik, sledilo je naslednje sekvenciranje z moškim zbirnikom, nato pa še ena ponovljena izvedba sekvenciranja ženskega zbirka. Prenos vzorca od izvedbe do izvedbe je bil ocenjen s primerjavo pokritosti amplikona kromosoma Y med ustreznimi replikati ponovitve izvedbe ženskega zbirka in izvedbo moškega zbirka. Mediana opaženega prenosa med posameznimi izvedbami je bila 0,0076 %

Vnos DNK

Kri (zarodna linija)

Obseg vnosa DNK iz krvi za pripravo knjižnice TruSeq Custom Amplicon Kit Dx z uporabo poteka dela modula Germline Variant je bil določen za Instrument NextSeq 550Dx. Ta obseg je bil ocenjen z izvajanjem študije serijskega redčenja s 13 vzorci Platinum Genome z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedovanje o

različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz v 23 različnih kromosomih. Knjižnica je bila sekvencirana na dveh instrumentih NextSeq 550Dx z uporabo ene serije kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

Pet vzorcev je bilo testiranih v dvojniku s petimi ravnmi vnosa DNK od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng in 12 ng). Osem vzorcev je bilo testiranih v enem replikatu na vsaki od petih ravni vnosa DNK. Za določitev točnosti so vzorčne genotipe primerjali z različico Platinum Genomes 2016-1.0. Rezultati so bili določeni za vsako raven vnosa. PPA za vsako vrsto variante (SNV, insercije in delecije) je predstavljen v [Preglednica 1](#); NPA je predstavljen v [Preglednica 2](#). Vse ravni vnosa so imele podobno točnost. Priporočeni vnos DNK za TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng, pri čemer predstavljata 100 ng in 25 ng zgornjo in spodnjo mejo za izpolnjevanje značilnosti učinkovitosti.

Preglednica 1 Rezultati PPA za vsak vnos DNK po vrsti variante

Vnos DNK (ng)	Vrsta variante	Pričakovane variante	TP	FN	Varianta brez določitev	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	Insercija	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	Delecija	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

Preglednica 2 NPA za vsak vnos DNK

Vnos DNK (ng)	TN	FP	Referenca brez določitev	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 (somatska)

Obseg vnosa DNK, fiksirane s formalinom in vklopljene v parafin (FFPE), za pripravo knjižnice TruSeq Custom Amplicon Kit Dx z uporabo poteka dela modula Somatic Variant je bilo določeno za instrument NextSeq 550Dx. Obseg vnosa DNK je bil ocenjen z izvajanjem študije serijskega redčenja s tremi vzorci Platinum Genome z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedovanje o različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz v 23 različnih kromosomih. Celične linije Platinum Genome GM12878 in GM12877 so bile fiksirane s formalinom in vklopljene v parafin, čemur je sledila ekstrakcija DNK. GM12878 je bil razredčen z GM12877 tako, da so bile frekvence variantnih alelov (VAF) 79-ih variant (55 SNV-jev, 9 insercij in 15 delecij) blizu 0,025, 0,05 oziroma 0,10. Poleg tega je imel vsak vzorec 91 variant z višjimi frekvencaми variant do 1,0 VAF. Vzorci so bili obdelani v dvojniku na petih ravneh vnosa DNK s povprečnim delta kvantitativnim ciklom (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 in 7,8, merjeno s kompletom TruSeq® Custom Amplicon Dx – FFPE QC. Vsaka knjižnica je bila sekvencirana na dveh instrumentih NextSeq 550Dx z uporabo dveh serij kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). Za določitev točnosti so določitev variant v vzorcu primerjali z različico Platinum Genomes 2016-1.0. PPA za vsako vrsto variante (SNV, insercije in delecije) je predstavljen v [Preglednica 3](#); NPA je predstavljen v [Preglednica 4](#). Priporočen vnos DNK za variante pri VAF 0,05 ali več je dCq ≤ 4 s 4,6, ki zagotavlja nižjo mejo za izpolnjevanje značilnosti učinkovitosti.

Preglednica 3 Rezultati PPA za vsak vnos DNK po vrsti variante

Povprečni dCq	Vrsta variante	Pričakovane variante	Pričakovano brez določitev	Tarčno redčenje VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Varianta brez določitev	PPA (%)	Varianta brez določitev	PPA (%)	Varianta brez določitev	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ni relevantno.	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

2,1	Insercija	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Delecija	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Preglednica 4 NPA za vsak vnos DNK

Povprečni dCq	Pričakovan divji tip	Tarčno redčenje VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referenca brez določitev	NPA (%)	Referenca brez določitev	NPA (%)	Referenca brez določitev	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

Analitična občutljivost (meja slepega [LoB] in meja zaznavnosti [LoD])

Ta študija je bila izvedena za oceno meje slepega (LoB) in meje zaznavnosti (LoD) za modul Somatic Variant na instrumentu NextSeq 550Dx. Izvedena je bila z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedovanje o različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz na 23 različnih kromosomih. Celične linije Platinum Genome GM12878 in GM12877 so bile fiksirane s formalinom in vklopljene v parafin, čemur je sledila ekstrakcija DNK. GM12878 je bila razredčena z GM12877 tako, da so bile variantne frekvence 74 variant (53 SNV, 7 insercij in 14 delecij) $0,05 \pm 0,02$. GM12877 in razredčena GM12878 (GM12878-D) sta bili testirani v šestih zaporednih začetnih dneh z enim samim instrumentom, izmenično med dvema serijama kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov), za skupno šest izvedb sekvenciranja. Rezultat tega testa je bilo 60 replikatov za vsako varianto v GM12878-D in 72 replikatov za vsako ustrezno koordinato divjega tipa v GM12877 za vsako serijo reagenta. LoB in LoD sta bili izračunani s klasičnim pristopom, navedenim v CLSI EP17-A2 z uporabo neparametrične možnosti. LoB in LoD sta bili izračunani za SNV, insercije in delecije ločeno z združevanjem variantnih frekvenc za določeno vrsto variante. Napaka tipa I je bila opredeljena kot 0,01, napaka tipa II pa kot 0,05.

Za LoB so bile združene variantne frekvence razvrščene od najnižje do najvišje, nato pa je bil za vsako serijo reagenta in za vsako vrsto variante izračunan položaj 99 v razvrstitvi ([Preglednica 5](#)). Modul Somatic Variant uporablja mejno vrednost (efektivni LoB) 0,026 VAF za določanje kvalitativnega zaznavanja variant. Izračunana LoB je potrdila, da ta mejna vrednost povzroči napako tipa I, ki ne presega 0,01.

Preglednica 5 Meja slepega

Vrsta variante	Skupna opažanja	LoB serije reagenta 1 (%)	LoB serije reagenta 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insercija	504	0,56	0,56
Delecija	1008	1,20	1,20

Za LoD je bil izračunan odstotek posamezne mutacijske frekvence za vsako serijo reagenta za vsako vrsto variante, ki je padla pod mejno vrednost 0,026 ([Preglednica 6](#)). Ker so bili odstotki manjši od napake tipa II 5 % (0,05), je bila mediana kombiniranih variantnih frekvenc izračunana kot LoD ([Preglednica 6](#)). LoD za vsako vrsto variante je bila sprejeta kot večja od dveh vrednosti, izračunanih za obe seriji reagentov – 4,97 % za SNV, 5,12 % za insercije in 5,26 % za delecije.

Preglednica 6 Meja zaznavnosti

Serija reagenta	Vrsta variante	Skupna opažanja	Št. meritev VAF < 2,6 %	% meritev VAF < 2,6 %	Meja zaznavnosti (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insercija	420	6	1,4	5,08
	Delecija	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insercija	420	5	1,2	5,12
	Delecija	840	7	0,80	5,26

Točnost

Zarodna linija

Naslednja študija je bila izvedena za oceno točnosti določanja variant modula Germline Variant na instrumentu Instrument NextSeq 550Dx z uporabo kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). 13 edinstvenih vzorcev Platinum Genome so testirali z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedovanje o različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz (150 amplikonov) na 23 različnih kromosomih. Skupno je bilo izvedenih devet izvedb s tremi instrumenti za sekvenciranje, tremi serijami reagentov in s tremi upravljavci v petih dneh zagona. Točnost je bila določena za SNV-je, insercije in delecije s primerjavo rezultatov z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo Platinum Genomes, različica 2016-1.0. Zanesljive genomske regije so bile opredeljene na podlagi te referenčne metode, razen če je navedeno drugače.

Preglednica 7 Povzetek ujemanja zarodne linije

Merila	Skupna opažanja ¹	Rezultat po opažanju ²	Rezultat po izvedbi ³
PPA za SNV	819	98,7	> 99,9
PPA za insercije	819	95,0	98,9
PPA za delecije	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Izračunano kot število vzorcev na izvedbo (91) × število izvedb (9) = 819.

²Najnižja opažena vrednost na replikat vzorca v vseh 9 izvedbah.

³Najnižja vrednost, ko so podatki iz vsake izvedbe analizirani v skupku.

Preglednica 8 vsebuje podatke študije, ki so predstavljeni s pozitivnim in negativnim odstotkom ujemanja na osnovi vzorca, pri čemer se rezultati variant primerjajo z različico Platinum Genomes 2016-1.0 za izračune PPA. Tri vrste variant (SNV-ji, insercije in delecije) so združene. Ker referenčna metoda zagotavlja le rezultate za variante posameznih nukleotidov in insercije/delecije, se ne-variantni rezultati baz primerjajo z referenčno sekvenco človeškega genoma hg19 za izračune NPA.

Preglednica 8 Ujemanje zarodne linije na vzorec

Vzorec	Povprečni delež določitve	Pričakovane različice ¹	TP	FN	Varianta brez določitve	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

¹Skupno število variant v vseh replikatih vzorca v 9 izvedbah.

Preglednica 9 vsebuje podatke študije, predstavljene na podlagi vzorca, pri čemer se rezultati variant primerjajo z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo. Zaznavanje se oceni za vsako vrsto variante – SNV-je, insercije in delecije – ločeno. Referenčni položaji so izključeni.

Preglednica 9 Ujemanje zarodne linije na vzorec po vrsti variante

Vzorec	SNV-ji			Insercije			Delecije		
	Pričakovano	TP	FN	Pričakovano	TP	FN	Pričakovano	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

Vzorci so bili nadalje analizirani za določanje majhnih insercij in delecij (indelov). Skupni povzetek je predstavljen v **Preglednica 10**. Skupno je bilo 71 indelov v velikosti od 1–24 bp za insercije in 1–25 bp za delecije.

Preglednica 10 Povzetek zaznavanja indelov zarodne linije

Vrsta variante	Pričakovane variante	TP	FN	Varianta brez določitev	PPA
Insercija	18522	18018	27	477	99,9
Delecija	17388	17073	0	315	100

Reprezentativni test je bil sestavljen iz 150 amplikonov, zasnovanih za pokrivanje različnih genomskih vsebin. Vsebnost GC amplikonov je znašala od 0,19 do 0,87. Amplikoni so imeli tudi razpon ponovitev enojnih nukleotidov (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidov in trinukleotidov. Podatki so bili zbrani na podlagi amplikona ([Preglednica 11](#)), da bi določili učinek genomske vsebine na odstotek pravilnih določitev. Odstotek pravilnih določitev je sestavljen iz variantnih in referenčnih določitev in je manjši od 100 %, če so določitve nepravilne ali jih ni.

Preglednica 11 Točnost na ravni amplikona: zarodna linija

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vseбина GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli A (5), Poli C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ni na voljo	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli T (5), poli A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ni na voljo	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli A (5), Poli T (5), Poli A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli G (6), Poli T (5), Poli A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ni na voljo	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Ni na voljo	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	Ni na voljo	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ni na voljo	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli G (6), poli C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ni na voljo	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ni na voljo	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Ni na voljo	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli G (5), indel	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	Poli T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli A (5), Poli T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Ni na voljo	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ni na voljo	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ni na voljo	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ni na voljo	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ni na voljo	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli A (5)	0,4	59787	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
73	11	101347052	101347136	85	85	Ni na voljo	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli A (5), CA(3), indel	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	Poli C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ni na voljo	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Ni na voljo	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli A (5), Poli T (7), Poli A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	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	Ni na voljo	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ni na voljo	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vseбина GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
101	16	1894910	1894972	63	63	Ni na voljo	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli T (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	Ni na voljo	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ni na voljo	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ni na voljo	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Ni na voljo	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Ni na voljo	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ni na voljo	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli T (5), Poli A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Ni na voljo	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ni na voljo	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ni na voljo	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ni na voljo	0,55	0	0	0	Ni na voljo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ni na voljo	0,48	0	0	0	Ni na voljo
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli A (5)	0,37	0	0	0	Ni na voljo

Rezultati sekvenciranja za vzorec NA12878 so bili primerjani z zelo zanesljivim genotipom za NA12878, ki so ga določili nacionalni inštituti za standarde in tehnologijo (NIST) (v.2.19). Od 150 amplikonov je bilo 92 amplikonov v celoti zajetih v visoko zanesljivih genomskih regijah, 41 amplikonov se je delno prekrivalo, 17 amplikonov pa se ni prekrivalo v sekvenci NIST. To je dalo 10.000 koordinat na replikat za primerjavo. Ne-variantne določitve baz so primerjali z referenčnim zaporedjem človeškega genoma hg19. Rezultati točnosti so prikazani v [Preglednica 12](#).

Preglednica 12 Ujemanje zarodne linije vzorca NA12878 s podatkovno bazo NIST

Vzorec	Št. amplikonov	Povprečni delež določitve	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Na podlagi podatkov, ki jih je dala ta študija zarodne linije z devetimi izvedbami, lahko Instrument NextSeq 550Dx dosledno sekvencira:

- Vsebnost GC ≥ 19 % (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih z 19-odstotno vsebnostjo GC so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,6 %)
- Vsebnost GC ≤ 87 % (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s 87-odstotno vsebnostjo GC so bile pravilno določene z ničelnim deležem brez določitve)
- Dolžine PolyA ≤ 9 (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s PolyA ponovitvami devetih nukleotidov so bile pravilno določene z ničelnim deležem brez določitve)
- Dolžine PolyT ≤ 10 (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s PolyT ponovitvami desetih nukleotidov so bile pravilno določene z ničelnim deležem brez določitve)
- Dolžine PolyG ≤ 7 (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s PolyG ponovitvami sedmih nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 1,0 %)
- Dolžine PolyC ≤ 6 (vse določene baze v 2457 sekvenciranih amplikonih s PolyC ponovitvami šestih nukleotidov so bile pravilno določene z ničelnim deležem brez določitve)
- Dolžine s ponovitvami dinukleotidov $\leq 11 \times$ (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s $11 \times$ ponovitvami dinukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,5 %)
- Dolžine s ponovitvami trinukleotidov $\leq 5 \times$ (vse določene baze v 819 sekvenciranih amplikonih s $5 \times$ ponovitvami trinukleotida so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,5 %)
- Dolžine insercij ≤ 24 (66.343 od 66.370 določenih baz v 819 sekvenciranih amplikonih z insercijami 24 nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 1,2 %; v regijah z insercijami 24 nukleotidov ni bilo nepravilnih določitev)
- Dolžine delecij ≤ 25 (vse določene baze v 2457 sekvenciranih amplikonih z delecijami 25 nukleotidov so bile pravilno določene z ničelnim deležem brez določitve)

Somatsko

Študija, opisana tukaj, je bila uporabljena za oceno točnosti določanja variant modula Somatic Variant na Instrument NextSeq 550Dx z uporabo kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

V tej študiji je bil uporabljen reprezentativni test, zasnovan za poizvedbo po različnih genih, ki pokrivajo 12.588 baz (150 amplikonov) v 23 različnih kromosomih. Za šest enoličnih vzorcev za ocenjevanje v študiji je bila ekstrahirana DNK Platinum Genome iz blokov, obdelanih s FFPE.

Vzorec DNK GM12877 je bil razredčen z vzorcem DNK GM12878 za ustvarjanje GM12877-D5 in GM12877-D7 kot kompleta z enoličnimi heterozigotnimi variantami s pogostnostjo variant blizu 5 % in 7 %. Vzorec DNK GM12878 je bil podobno razredčen z vzorcem DNK GM12877 za ustvarjanje GM12878-D5 in GM12878-D7. Vsak od vzorcev je bil testiran v triplikatu, razen razredčenih vzorcev, ki so bili testirani v replikatih po šest. Skupno je bilo izvedenih devet izvedb s tremi instrumenti za sekvenciranje, tremi serijami reagentov in s tremi upravljavci v petih dneh zagona. Točnost je bila določena za SNV-je, insercije in delecije s primerjavo rezultatov z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo Platinum Genomes, različica 2016-1.0. Zanesljive genomske regije so bile opredeljene na podlagi te referenčne metode, razen če je navedeno drugače.

Preglednica 13 Povzetek somatskega ujemanja

Merila	Skupna opažanja ¹	Rezultat po opažanju ²	Rezultat po izvedbi ³
PPA za SNV	378	98,9	99,9
PPA za insercije	378	96,9	99,9
PPA za delecije	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Izračunano kot število vzorcev na izvedbo (42) × število izvedb (9) = 378.

²Najnižja opažena vrednost na replikat vzorca v vseh 9 izvedbah.

³Najnižja vrednost, ko so podatki iz vsake izvedbe analizirani v skupku.

Preglednica 14 vsebuje podatke študije, ki so predstavljeni s pozitivnim in negativnim odstotkom ujemanja na vzorec, pri čemer se rezultati variant primerjajo z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo za izračune PPA. Tri vrste variant (SNV-ji, insercije in delecije) so združene. Ker referenčna metoda zagotavlja le rezultate za variante posameznih nukleotidov in insercije/delecije, se ne-variantni rezultati baz primerjajo z referenčno sekvenco človeškega genoma hg19 za izračune NPA.

Preglednica 14 Somatsko ujemanje na vzorec

Vzorec	Povprečni delež določitev	Pričakovano	TP	FN	Varianta brez določitev	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

Vzorec	Povprečni delež določitve	Pričakovano	TP	FN	Varianta brez določitev	TN	FP	PPA	NPA	OPA
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

Preglednica 15 vsebuje podatke študije, predstavljene na podlagi vzorca, pri čemer se rezultati variant primerjajo z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo. Zaznavanje se oceni za vsako vrsto variante – SNV-je, insercije in delecije – ločeno. Referenčni položaji so izključeni.

Preglednica 15 Somatsko ujemanje na vzorec glede na vrsto variante

Vzorec	SNV-ji			Insercije			Delecije		
	Pričakovano	TP	FN	Pričakovano	TP	FN	Pričakovano	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

Deset vzorcev je bilo nadalje analiziranih za določanje majhnih insercij in delecij (indelov) ([Preglednica 16](#)). Skupno je bilo 71 indelov v velikosti od 1–24 bp za insercije in 1–25 bp za delecije.

Preglednica 16 Povzetek zaznavanja somatskih indelov

Vrsta variante	Pričakovane variante	TP	FN	Varianta brez določitev	PPA
Insercija	10773	10282	9	482	99,2
Delecija	11502	10667	5	830	> 99,9

Zasnovanih je bilo 150 amplikonov za pokrivanje različne genomske vsebine. Vsebina GC amplikonov je znašala od 0,19 % do 0,87 %. Amplikoni so imeli tudi razpon ponovitev enojnih nukleotidov (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidov in trinukleotidov. Podatki so bili zbrani na podlagi amplikona ([Preglednica 17](#)), da bi določili učinek genomske vsebine na odstotek pravih določitev. Odstotek pravih določitev je sestavljen iz variantnih in referenčnih določitev in je manjši od 100 %, če so določitve nepravilne ali jih ni.

Preglednica 17 Točnost na ravni amplikona: somatske variante

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitev	% pravih določitev
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poli A (5), Poli C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poli G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poli T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poli A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Ni na voljo	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poli A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poli T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poli T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poli T (5), poli A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Ni na voljo	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poli T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ni na voljo	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poli A (5), Poli T (5), Poli A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poli A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poli G (6), Poli T (5), Poli A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Ni na voljo	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poli A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poli A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poli A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Ni na voljo	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	Ni na voljo	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poli A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poli T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poli G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poli T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poli C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poli G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poli A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Ni na voljo	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poli A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poli G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsečina	Vsečina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
48	7	149503875	149503965	91	91	Poli G (6), poli C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Ni na voljo	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Ni na voljo	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poli G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poli G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Ni na voljo	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poli C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poli G (5), indel	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	Poli T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poli A (5), Poli T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Ni na voljo	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Ni na voljo	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Ni na voljo	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Ni na voljo	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Ni na voljo	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poli A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Ni na voljo	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poli G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
76	11	120357801	120357885	85	85	Poli A (5), CA(3), indel	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	Poli C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poli A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Ni na voljo	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poli A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poli G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Ni na voljo	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poli A (5), Poli T (7), Poli A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	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	Ni na voljo	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poli T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poli A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poli C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poli G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poli T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Ni na voljo	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Ni na voljo	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poli C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vseбина	Vseбина GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
104	16	57954406	57954509	104	104	Poli C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poli T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poli C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poli T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poli A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poli A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poli A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poli T (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	Ni na voljo	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poli A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poli A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Ni na voljo	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Ni na voljo	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Ni na voljo	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Ni na voljo	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Ni na voljo	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9

Amplikon	Kromosom	Začetek amplikona	Konec amplikona	Analizirana velikost fragmenta	Baze v zanesljivih regijah	Amplikonska genomska vsebina	Vsebina GC	Pravilne določitve	Nepravilne določitve	Brez določitve	% pravilnih določitev
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poli G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poli T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poli A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poli T (5), Poli A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Ni na voljo	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Ni na voljo	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poli T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poli C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Ni na voljo	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ni na voljo	0,55	0	0	0	NA
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ni na voljo	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poli A (5)	0,37	0	0	0	NA

Rezultati sekvenciranja za vzorec GM12878 so bili primerjani z zelo zanesljivim genotipom za NA12878, ki ga je določil Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo (NIST) (v.2.19). Od 150 amplikonov je bilo 92 amplikonov v celoti zajetih v visoko zanesljivih genomskih regijah, 41 amplikonov se je delno prekrivalo, 17 amplikonov pa se ni prekrivalo v sekvenci NIST. To je dalo 10.000 koordinat na replikat za primerjavo. Ne-variantne določitve baz so primerjali z referenčnim zaporedjem človeškega genoma hg19. Rezultati točnosti so prikazani v [Preglednica 18](#).

Preglednica 18 Somatsko ujemanje vzorca GM12878 s podatkovno bazo NIST

Vzorec	Št. amplikonov	Povprečni delež določitve	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Na podlagi podatkov, ki jih je dala ta somatska študija z devetimi izvedbami, lahko Instrument NextSeq 550Dx dosledno sekvencira:

- Vsebnost GC ≥ 19 % (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih z 19-odstotno vsebnostjo GC so bile pravilno določene z deležem brez določitve 2,6 %)
- Vsebnost GC ≤ 87 % (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih s 87-odstotno vsebnostjo GC so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,6 %)
- Dolžine PolyA ≤ 9 (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih s PolyA ponovitvami devetih nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 2,5 %)
- Dolžine PolyT ≤ 10 (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih s PolyT ponovitvami desetih nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve manj kot 0,1 %)
- Dolžine PolyG ≤ 6 (vse določene baze v 2268 sekvenciranih amplikonih s PolyG ponovitvami šestih nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,5 %)
- Dolžine PolyC ≤ 6 (vse določene baze v 756 sekvenciranih amplikonih s PolyC ponovitvami šestih nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,4 %)
- Dolžine s ponovitvami dinukleotidov ≤ 4 (vse določene baze v 1890 sekvenciranih amplikonih s 4 $\times$ ponovitvami dinukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,9 %)
- Dolžine s ponovitvami trinukleotidov $\leq 5 \times$ (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih s 5 $\times$ ponovitvami trinukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 1,4 %)
- Dolžine insercij ≤ 23 (vse določene baze v 378 sekvenciranih amplikonih z insercijami 23 nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,8 %)
- Dolžine delecij ≤ 25 (vse določene baze v 1134 sekvenciranih amplikonih z insercijami 25 nukleotidov so bile pravilno določene z deležem brez določitve 0,7 %)

Natančnost

Natančnost instrumenta Instrument NextSeq 550Dx je bila določena s testiranjem 13 enoličnih vzorcev Platinum Genome s tremi instrumenti, tremi serijami reagentov in tremi upravljavci, z ustvarjenimi devetimi izvedbami sekvenciranja v petih začetnih dneh. Reprezentativni test, vzorci in referenčna metoda so enaki, kot je opisano za študijo točnosti zarodne linije. Prispevki natančnosti so bili določeni z analizo komponente variance z uporabo VAF kot odzivne spremenljivke in izračunom standardnih odklonov na ravni komponent za instrument, serijo reagentov, upravljavca in začetni dan ([Preglednica 19](#)). Skupno število opazovanj, uporabljenih v analizi za vsako spremenljivo komponento instrumenta, upravljavca ali serije reagentov je bilo 699, 176 in 235 za SNV-je, insercije in delecije.

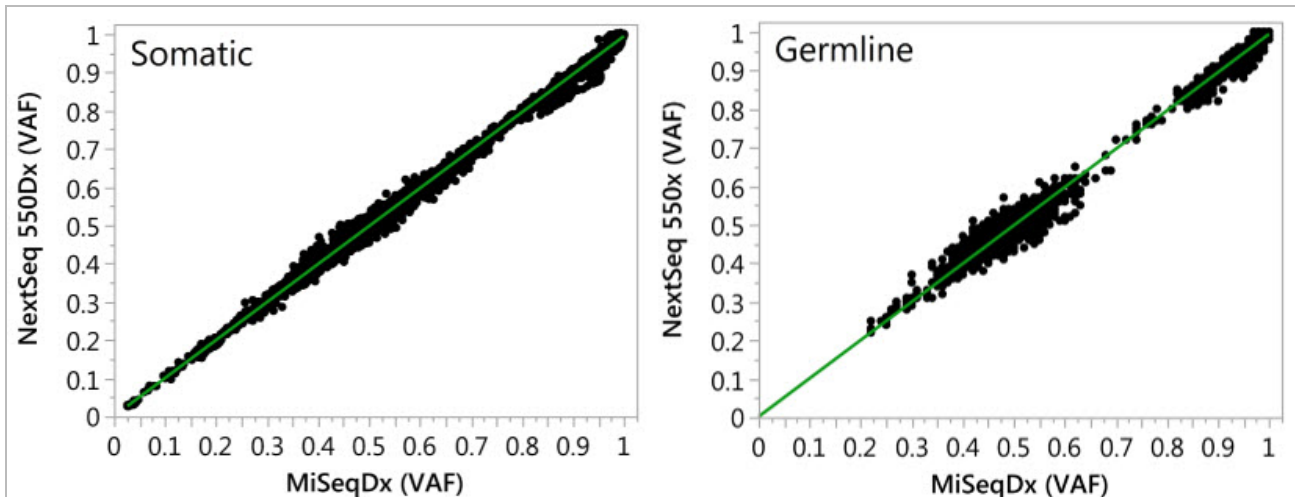
Preglednica 19 Rezultati natančnosti za instrument NextSeq 550Dx (standardna deviacija)

Komponenta	Vrsta variante	SD komponente		Skupna SD	
		Najv.	Mediana	Najv.	Mediana
Serija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insercija	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delecija	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insercija	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delecija	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Upravljavec	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insercija	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delecija	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dan	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insercija	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delecija	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Primerjava metod (platforma za sekvenciranje)

Vzorci polne krvi in FFPE so bili ocenjeni na instrumentu Instrument NextSeq 550Dx in MiSeqDx z uporabo zarodnih in somatskih potekov dela TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Ujemanje pogostnosti variant za vzorce krvi in FFPE so ocenili z več reprezentativnimi testi. [Slika 2](#) prikazuje korelacijo VAF med dvema instrumentoma za en reprezentativni test, [Preglednica 20](#) pa povzema to korelacijo po testni plošči. Na podlagi močne korelacije med instrumentoma MiSeqDx in Instrument NextSeq 550Dx je bilo ugotovljeno, da značilnosti učinkovitosti, povezane s predanalitičnimi dejavniki (npr. metodami ekstrakcije ali motečimi snovmi), veljajo za oba instrumenta. Za dodatne podrobnosti glejte navodila za uporabo TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Slika 2 VAF korelacija med instrumentoma MiSeqDx in NextSeq 550Dx za vzorce FFPE (levo) in vzorce krvi (desno) z uporabo testa 1



Preglednica 20 Rezultati primerjave metod z uporabo enoličnih vzorcev krvi in FFPE

Vir gDNK	Test (Oligo Panel)	Biološki replikati (vzorci)	Tehnični replikati (na vzorec)	Opazovanja (št. variant)	Naklon	Presečišče	Korelacija (R^2)
Kri	Test 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Kri	Test 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Test 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Test 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Dve podatkovni točki sta bili odstranjeni na podlagi navedene omejitve za modul Germline Variant.

²Koeficient določanja za prikaze VAF, kot je prikazano na sliki 2.

Ponovljivost

Ponovljivost Instrument NextSeq 550Dx je bila ocenjena z uporabo vzorcev Platinum Genome z reprezentativnim testom, zasnovanim za poizvedbo različnih genov, ki pokrivajo 12.588 baz v 23 različnih kromosomih z uporabo 150 tarčnih ampliconov. Testiranje zarodne linije je bilo sestavljeno iz sedmih replikatov 13 vzorcev; somatsko testiranje je bilo sestavljeno iz šestih replikatov sedmih vzorcev na različnih ravneh VAF. Vzorci so bili pripravljeni z uporabo kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testiranje so izvedli na treh zunanjih mestih z uporabo ene serije kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). Na vsakem testnem mestu je bil uporabljen en instrument NextSeq 550Dx. Dva upravljavca sta izvedla testiranje na vsakem mestu. Vsak upravljavalec je izvedel testiranje v treh zaporednih dneh zagona za vsako vrsto vzorca za skupno 36 izvedb na treh mestih. To testiranje je dalo 18 izvedb za vsak zarodni in somatski potek dela.

Zarodna linija

Variante zarodne linije z ravniyo VAF $\geq 0,2$ so sporočene kot pozitivne (variante). Za pričakovane pozitivne variante zarodne linije so bili ocenjeni podatki za delež brez določitve in delež pravilno določenih pozitivnih določitev v okviru vsake vrste variant (SNV, insercije, delecije). [Preglednica 21](#) povzema opažene deleže, skupaj s spodnjimi in z zgornjimi 95-odstotnimi ravnmi zaupanja (LCL/UCL), izračunanimi z metodo Wilsonove ocene, za vsako vrsto variante.

Preglednica 21 Opazovanja določitev zarodne linije za pričakovane pozitivne rezultate po vrsti variante

Vrsta variante	Brez določitve			Pravilna pozitivna določitev			95 % LCL	95 % UCL
	Opaženo	Skupno	Odstotek	Opaženo	Skupno	Odstotek		
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Insercije	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Delecije	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Variante zarodne linije z ravniyo VAF $< 0,2$ so sporočene kot negativne (divji tip). Pri pričakovanih negativnih lokacijah zarodne linije so bili podatki ocenjeni za delež brez določitve in delež pravilno določenega divjega tipa. [Preglednica 22](#) povzema opažene deleže, skupaj s spodnjimi in z zgornjimi 95-odstotnimi ravnmi zaupanja (LCL/UCL), izračunanimi z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 22 Opazovanja določitev zarodne linije za pričakovane negativne rezultate

Vrsta variante	Brez določitve			Pravilna negativna določitev			95 % LCL	95 % UCL
	Opaženo	Skupno	Odstotek	Opaženo	Skupno	Odstotek		
Divji tip	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Variante zarodne linije z VAF $\geq 0,2$ in $< 0,7$ so določene kot pozitivne heterozigotne za varianto, variante z VAF $\geq 0,7$ pa so določene kot pozitivne homozigotne za varianto. Vzorci zarodne linije s heterozigotnimi variantami so bili uporabljeni za ugotavljanje, ali bi inherentna variabilnost testa vplivala na določitev genotipa. Cx je bil določen za obe mejni vrednosti (0,2 za heterozigotne in 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemer je x delež ponovljenih testov, ki presegajo mejne vrednosti. Za spodnjo mejo 0,2 VAF je bil Cx $\geq 99,999\%$, kar pomeni, da bi bilo $\geq 99,999\%$ heterozigotnih variant določenih kot heterozigotne. Glede na zgornjo mejo 0,7 VAF je bil Cx $\leq 0,001\%$, kar kaže, da bi bilo $\leq 0,001\%$ heterozigotnih variant določenih kot homozigotne. [Preglednica 23](#) povzema rezultate po vrsti variante.

Variante zarodne linije z VAF $\geq 0,2$ in $< 0,7$ so določene kot pozitivne heterozigotne za varianto, variante z VAF $\geq 0,7$ pa so določene kot pozitivne homozigotne za varianto. Vzorci zarodne linije s heterozigotnimi variantami so bili uporabljeni za ugotavljanje, ali bi inherentna variabilnost testa vplivala na določitev genotipa. Cx je bil določen za obe mejni vrednosti (0,2 za heterozigotne in 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemer je x delež ponovljenih testov, ki presegajo mejni vrednosti. Glede na spodnjo mejo 0,2 VAF je bil Cx $\geq 99,999\%$, kar

kaže, da bi bilo $\geq 99,999\%$ heterozigotnih variant določenih kot heterozigotne. Za zgornjo mejo 0,7 VAF je bil $C_x \leq 0,001\%$, kar kaže, da bi bilo $\leq 0,001\%$ heterozigotnih variant določenih kot homozigotne. [Preglednica 23](#) povzema rezultate po vrsti variante.

Preglednica 23 Vrednosti C_x zarodne linije za heterozigotne variante

Vrsta variante	Meja pri 0,2 VAF	Meja pri 0,7 VAF
	$\geq C_{99,999\%}$	$\leq C_{0,001\%}$
SNV	94/94	94/94
Insercije	24/24	24/24
Delecije	35/35	35/35
Skupno	153	153

Somatsko

Somatske variante z ravni VAF $\geq 0,026$ so sporočene kot pozitivne (varianta). Opažanja z ravni VAF $\geq 0,01$ in $< 0,026$ so za namene te analize veljala za dvoumna (niti pozitivno niti negativno, označeno kot nizka frekvenca variant). Za oceno učinkovitosti so bili rezultati izračunani na tri načine:

- Najboljši primer: vsak dvoumen rezultat se je štel za pravilno pozitivno določitev (ujemanje s pričakovanimi rezultati)
- Najslabši primer: vsak dvoumen rezultat se je štel za napačno določitev (neujemanje s pričakovanimi rezultati)
- Primer izključitve: vsak dvoumen rezultat je bil izključen iz analize

Tri preglednice, [Preglednica 24](#), [Preglednica 25](#) in [Preglednica 26](#), povzemajo ločeno rezultate določitev za najboljši primer, najslabši primer in primer izključitve, skupaj spodnjimi in zgornjimi 95-odstotnimi ravni zaupanja (LCL/UCL), izračunanimi z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 24 Opazovanja somatskih določitev za pričakovane pozitivne rezultate po vrsti variante (najboljši primer)

Vrsta variante	Pravilna pozitivna določitev				
	Opaženo	Skupno	Odstotek	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Preglednica 25 Opazovanja somatskih določitev za pričakovane pozitivne rezultate po vrsti variante (najslabši primer)

Vrsta variante	Pravilna pozitivna določitev				
	Opaženo	Skupno	Odstotek	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Preglednica 26 Opazovanja somatskih določitev za pričakovane pozitivne rezultate po vrsti variante (odstranjene dvoumne določitve)

Vrsta variante	Pravilna pozitivna določitev				
	Opaženo	Skupno	Odstotek	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Somatske variante z ravno VAF < 0,01 so sporočene kot negativne določitve (divji tip). Pri pričakovanih negativnih somatskih lokacijah so bili podatki ocenjeni za delež brez določitve in delež pravilno določenega divjega tipa. Pravilne določitve divjega tipa so bile ugotovljene tako, da so bile izključene nedoločitve in od celote odštete opažene določitve, ki so spadale v dvoumno območje (raven VAF $\geq 0,01$ in < 0,026), pa tudi nepravilne določitve, ki so bile nad mejo (raven VAF $\geq 0,026$). [Preglednica 27](#) povzema opažene, skupne in odstotne rezultate za negativne somatske lokacije za delež brez določitve in delež pravilne določitve divjega tipa skupaj s spodnjimi in zgornjimi 95-odstotnimi ravni zaupanja (LCL/UCL), izračunanimi z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 27 Opazovanja somatskih določitev za pričakovane negativne rezultate

Variant a Vrsta	Brez določitve					Pravilna določitev				
	Opažen o	Skupno	Odstote k	Dvoum n o	Nepraviln o	Pravilno	Skupno	Odstote k	95 % LCL	95 % UCL
Divji tip	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Somatski vzorci na različnih ravneh VAF za isto varianto so bili ocenjeni za določitev C95 testa (znotraj posamezne vrste variante). Za oceno variabilnosti v bližini mejne vrednosti testa so bili uporabljeni vzorci, ki so imeli pričakovane vrednosti VAF med 0,02 in 0,07. C95 je bil določen za vsako varianto, najvišji C95 za posamezno vrsto variante pa je naveden v [Preglednica 28](#).

Preglednica 28 Povzetek somatskih C95

Vrsta variante	N	C95
SNV	74	0,0613
Insercija	24	0,0573
Delecija	33	0,0575

Učinkovitost kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov)

Pregled

Za NextSeq 550Dx sta podprta dva kompleta reagentov: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Da bi dokazali, da lahko NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) izpolnjuje zahteve glede analitske učinkovitosti, preverjene in potrjene s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov), so izvedli študije s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Z uporabo TruSeq Custom Amplicon Kit Dx so pripravili dve knjižnici, eno s potekom dela Germline in drugo s potekom dela Somatic. Knjižnici iz vsakega poteka dela sta bili testirani s tremi serijami NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) na treh instrumentih NextSeq 550Dx. Poleg tega je testiranje za vsak potek dela vključevalo eno samo izvedbo s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

Analitična občutljivost (meja slepega [LoB] in meja zaznavnosti [LoD])

Preverjanje s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) je pokazalo, da lahko Instrument NextSeq 550Dx zazna variante pri 0,05 VAF z napako tipa II $\leq 0,05$ in da mejna vrednost 0,026 VAF, ki jo uporablja modul za določanje somatskih variant (efektivna LoB), podpira napako tipa I $\leq 0,01$. Na podlagi teh trditev se pričakuje, da je varianta pri 0,05 VAF večja ali enaka 0,026 VAF 95 % časa in da je položaj divjega tipa manjši od 0,026 VAF 99 % časa. Za zagotovitev, da so bile te trditve izpolnjene s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov), so bile izvedene ponavljajoče se meritve na instrumentu NextSeq 550Dx z vzorci divjega tipa (vzorci LoB) in z vzorci, ki vsebujejo variante pri 0,05 VAF (vzorci LoD) z uporabo kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Delež določitev nad in pod mejno vrednostjo 0,026 so nato primerjali s trditvami, ugotovljenimi s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

Preizkušanje je vključevalo dva vzorca na meji detekcije (LoD), od katerih je imel vsak edinstven nabor variant, ciljano nastavljenih na 0,05 VAF, ter ustrezne vzorce za določitev meje praznega (LoB), ki so bili divji tip za tarčne variante. Za pripravo knjižnice so bili vzorci LoD in LoB obdelani v replikatih po osem oziroma sedem z uporabo TruSeq® Custom Amplicon Kit Dx. Knjižnice so bile sprva sekvencirane z uporabo kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) za identifikacijo variant/genomskih koordinat za oceno LoB/LoD s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Za analizo LoD so bile uporabljene vse

varianste s povprečnim VAF med 0,045 in 0,055 (varianste LoD) na osnovi rezultatov s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) (N = 51 variant). Za analizo LoB je bilo ocenjenih 51 ustreznih genomskih koordinat.

Za oceno NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) so bile sekvencirane knjižnice v treh izvedbah v treh zaporednih dneh z uporabo istega instrumenta in serije kompleta reagentov. To testiranje je dalo 24 ponovitev za vsako od 51 variant LoD in 21 ponovitev za vsako od ustreznih položajev divjega tipa. Delež določitev divjega tipa z VAF < 0,026 je naveden v [Preglednica 29](#). Delež določitev varianste LoD z VAF, ki je večji ali enak 0,026, je naveden v [Preglednica 30](#).

Preglednica 29 Delež določitev < 0,026 za položaje divjega tipa (ocena trditev za LoB)

Vrsta variante	Ocenjeni položaji	Skupna opažanja	Št. meritev VAF $\geq 2,6\%$	Delež < 2,6 %	Delež 95 % Interval zaupanja
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Insercija	11	231	0	1	0,984 – 1
Delecija	8	168	0	1	0,978 – 1

Preglednica 30 Delež določitev $\geq 0,026$ VAF za varianste LoD (ocena trditev za LoD)

Vrsta variante	Ocenjeni položaji	Skupna opažanja	Št. meritev VAF < 2,6 %	Št. meritev VAF $\geq 2,6\%$	Delež $\geq 2,6\%$	Delež 95 % Interval zaupanja
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Insercija	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Delecija	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Točnost

Zarodna linija

Naslednja študija je bila izvedena za oceno točnosti določanja variant z modulom za varianste zarodne linije z uporabo kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Dvanajst enoličnih vzorcev Platinum Genome je bilo testiranih z reprezentativnim testom. Skupaj je bilo izvedenih 11 izvedb s tremi instrumenti NextSeq 550Dx in tremi kompleti reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).

Točnost je bila določena za SNV-je, insercije in delecije s primerjavo rezultatov z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo Platinum Genomes, različica 2016-1.0. Za referenco so na voljo rezultati točnosti ene izvedbe sekvenciranja s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). Povzetek rezultatov je naveden v [Preglednica 31](#).

Preglednica 31 Povzetek ujemanja zarodne linije

Merila	Skupna opažanja (v2.5) ¹	Rezultat po opažanju (v2.5) ²	Rezultat po opažanju (v2) ³	Rezultat po izvedbi (v2.5) ⁴	Rezultat po izvedbi (v2) ⁴
PPA za SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA za insercije	1056	100	100	100	100
PPA za delecije	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

¹Izračunano kot število vzorcev na izvedbo × število izvedb (96 vzorcev na izvedbo × 11 izvedb = 1056 opazovanj).

²Najnižja opažena vrednost po replikatu vzorca v vseh izvedbah (na podlagi 11 izvedb za NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Najnižja opažena vrednost po replikatu vzorca v 1 izvedbi (skupno 96 opazovanj).

⁴Najnižja vrednost, ko so podatki iz vsake izvedbe analizirani v skupku.

Somatsko

Naslednja študija je bila izvedena za oceno točnosti določanja variant modula Somatic Variant na instrumentu NextSeq 550Dx z uporabo kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov). Deset FFPE vzorcev Platinum Genome (dva z variantami, razredčenimi do 0,05 VAF) so testirali z reprezentativnim testom. Skupaj je bilo izvedenih 11 izvedb s tremi instrumenti NextSeq 550Dx in tremi serijami kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).

Točnost je bila določena za SNV-je, insercije in delecije s primerjavo rezultatov z dobro opisano sestavljeno referenčno metodo Platinum Genomes, različica 2016-1.0. Za referenco so na voljo rezultati točnosti ene izvedbe sekvenciranja s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). Povzetek rezultatov je naveden v [Preglednica 32](#).

Preglednica 32 Povzetek somatskega ujemanja

Merila	Skupna opažanja (v2.5) ¹	Rezultat po opažanju (v2.5) ²	Rezultat po opažanju (v2) ³	Rezultat po izvedbi (v2.5) ⁴	Rezultat po izvedbi (v2) ⁴
PPA za SNV	528	100	100	100	100
PPA za insercije	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA za delecije	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Izračunano kot število vzorcev na izvedbo × število izvedb (48 vzorcev na izvedbo × 11 izvedb = 528 opazovanj).

²Najnižja opažena vrednost po replikatu vzorca v vseh izvedbah (na podlagi 11 izvedb za NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Najnižja opažena vrednost po replikatu vzorca v 1 izvedbi (skupno 96 opazovanj).

⁴Najnižja vrednost, ko so podatki iz vsake izvedbe analizirani v skupku.

Natančnost

Zarodna linija

Natančnost kompleta reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) modulom Germline Variant je bila ocenjena z vzorci Platinum Genome in z reprezentativnim testom. Testiranje je bilo sestavljeno iz ene priprave knjižnice z uporabo kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx in je vključevalo 12 vzorcev, obdelanih s po osmimi replikati. Knjižnice so bile sekvencirane s tremi serijami kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) in tremi instrumenti NextSeq 550Dx za skupno devet izvedb sekvenciranja.

Vzorci s heterozigotnimi variantami so bili uporabljeni za ugotavljanje, ali bi inherentna variabilnost testa vplivala na določitev genotipa (N = 153 enoličnih heterozigotnih variant). Cx je bil določen za obe mejni vrednosti modula Germline Variant (0,2 za heterozigotne in 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemer je x delež ponovljenih testov, ki presegajo mejne vrednosti. Za spodnjo mejo 0,2 VAF je bila varianta z najmanjšim Cx za komplet NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) > 99,9 %, kar kaže, da bi > 99,9 % heterozigotnih variant določili kot heterozigotne. Za zgornjo mejo 0,7 VAF je bila varianta z največjim Cx za komplet reagentov NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) < 1,5 %, kar kaže, da bi bilo ≤ 1,5 % heterozigotnih variant določenih kot homozigotne. [Preglednica 33](#) povzema rezultate po vrsti variante. Za referenco so na voljo vrednosti Cx ene izvedbe sekvenciranja s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

Preglednica 33 Vrednosti Cx zarodne linije za heterozigotne variante

Vrsta variante	N	Meja pri 0,2 VAF		Meja pri 0,7 VAF	
		Najmanjši Cx (v2.5) ¹	Najmanjši Cx (v2) ²	Največji Cx (v2.5) ¹	Največji Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9	> 99,9	1,5 %	1,0 %
Insercije	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Delecije	35	100 %	> 99,9	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Vrednosti Cx na podlagi ocen skupnih standardnih odklonov iz analize komponent variance.

²Vrednosti Cx na podlagi standardnih odklonov vzorca.

Somatsko

Natančnost NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) z modulom Somatic Variant je bila ocenjena s FFPE vzorci Platinum Genome in z reprezentativnim testom. Testiranje je bilo sestavljeno iz ene priprave knjižnice z uporabo kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx in je vključevalo dva vzorca s po osmimi replikati. Knjižnice so bile sekvencirane z uporabo treh serij kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) in treh instrumentov NextSeq 550Dx za skupno devet izvedb sekvenciranja.

Somatske variante s pričakovanimi vrednostmi $VAF \leq 0,10$ VAF ($N = 131$ enoličnih variant) so bile uporabljene za oceno variabilnosti instrumenta v bližini mejne vrednosti VAF modula Somatic Variant (somatske variante z ravni VAF $\geq 0,026$ so določene pozitivno za varianto). Vrednosti C95 so bile določene za vsako somatsko varianto. Vrednosti C95 predstavljajo VAF, pri katerem je verjetnost, da bo večja od mejne vrednosti VAF modula Somatic Variant, 95 %. Najvišje vrednosti C95 glede na vrsto variante so navedene v [Preglednica 34](#). Za referenco so na voljo rezultati C95 ene izvedbe sekvenciranja s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov).

Preglednica 34 Povzetek somatskih C95

Vrsta variante	Št. ocenjenih variant	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insercije	24	0,062	0,061
Delecije	33	0,060	0,060

¹Vrednosti C95 na podlagi ocen skupnih standardnih odklonov iz analize komponent variance.

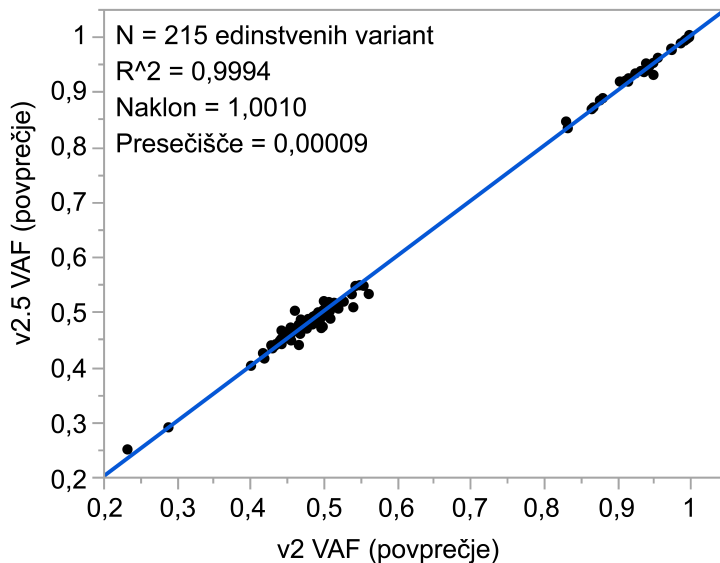
²Vrednosti C95 na podlagi standardnih odklonov vzorca.

Primerjava metod (komplet reagentov)

Zarodna linija

Povprečne VAF za 215 enoličnih variant so ocenili z obema kompletoma reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5k (300 ciklov) z rezultati, ki jih je ustvaril modul Germline Variant. Povprečja VAF so izračunali iz 11 izvedb sekvenciranja (v2.5) in ene izvedbe sekvenciranja (v2). Za izračun povprečja za vsako varianto je bilo uporabljenih vsaj osem replikatov. [Slika 3](#) prikazuje korelacijo VAF med dvema kompletoma reagentov. Na osnovi močno linearne korelacije VAF in podobnosti rezultatov med kompletoma reagentov so značilnosti učinkovitosti, prvotno preverjene in potrjene s kompletom reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) z modulom Germline Variant, določili kot veljavne za NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).

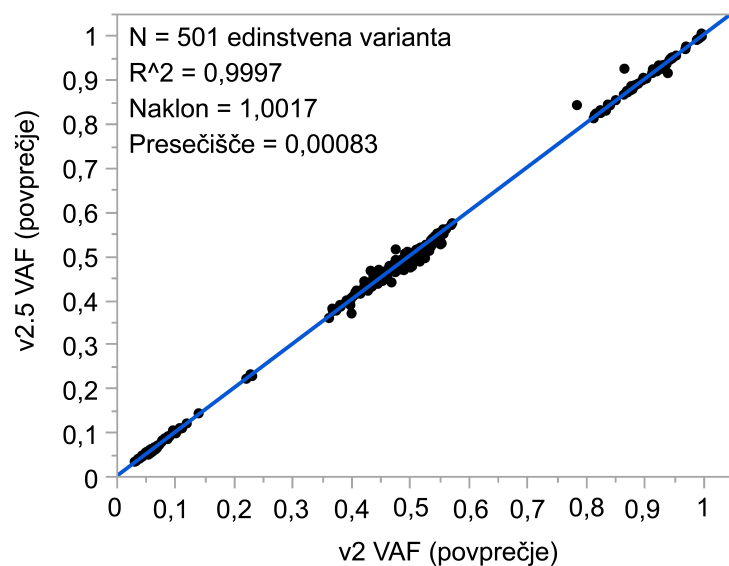
Slika 3 Korelacija frekvence alelov (VAF) modula Germline Variant med kompletoma reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).



Somatsko

Povprečne VAF za 501 enoličnih variant so ocenili z obema kompletoma reagentov NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5k (300 ciklov) z rezultati, ki jih je ustvaril modul Somatic Variant. Povprečja VAF so izračunali iz 11 izvedb sekvenciranja (v2.5) in ene izvedbe sekvenciranja (v2). Za izračun povprečja za vsako enolično varianto so bili uporabljeni vsaj trije replikati. [Slika 4](#) prikazuje korelacijo VAF med dvema kompletoma reagentov. Na osnovi korelacije VAF in podobnosti rezultatov med kompletoma reagentov so značilnosti učinkovitosti, preverjene in potrjene s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) z modulom Somatic Variant, določili kot veljavne za NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).

Slika 4 Korelacija frekvence variantnih alelov (VAF) modula Somatic Variant med kompletoma NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov) in NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov).



Zgodovina revizij

Dokument	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200031448 v00	Junij 2023	Prva izdaja. Ta dokument nadomešča prejšnji dokument 1000000030326. Spremembe dokumenta 1000000030326 v6, prisotne v novem dokumentu: • Dodana vsebina za podporo izbirnemu strežniku Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx. • Posodobljena številka dela zračnega filtra. Predhodne spremembe dokumenta 1000000030326: • Posodobitve, narejene za popravek vsebine, ki je bila nenamerno dodana iz izvirne programske opreme. • Dodana opozorila in previdnostni ukrepi glede poročanja o resnih zapletih. • Dodana izjava k principom postopka, ki navaja predvidenega uporabnika. • Odstranjen sklic na komplet reagentov High Output Reagent Kit v2 (300 ciklov). • Dodan sklic na komplet reagentov High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciklov). • Dodana preglednica z zgodovino revizij. Posodobljen naslov pooblaščenega predstavnika v EU.

Patenti in blagovne znamke

Ta dokument in vsebina v njem sta last družbe Illumina, Inc. in njenih podružnic (»Illumina«) ter sta namenjena le pogodbeno določeni uporabi njenih strank v povezavi z uporabo izdelkov, ki so opisani v tem dokumentu, in za noben drug namen. Tega dokumenta in vsebine v njem ne smete uporabljati ali distribuirati za kateri koli drug namen in/ali ju kakor koli drugače posredovati, razkriti ali razmnoževati brez predhodnega pisnega soglasja družbe Illumina. Illumina vam s tem dokumentom ne podeljuje nobene licence v okviru svojega patenta, blagovne znamke, avtorskih pravic ali pravic iz običajnega prava in nobenih podobnih pravic tretjih oseb.

Ustrezno kvalificirano in usposobljeno osebje mora natančno in dosledno upoštevati navodila v tem dokumentu, da zagotovi pravilno in varno uporabo izdelkov, opisanih v njem. Pred uporabo teh izdelkov morate v celoti prebrati vsebino tega dokumenta in se seznaniti z njo.

ČE NE PREBERETE VSEH NAVODIL V TEM DOKUMENTU IN JIH NE UPOŠTEVATE DOSLEDNO, LAHKO POVZROČITE OKVARO IZDELKOV, TELESNE POŠKODBE OSEB, VKLJUČNO Z UPORABNIKI IN DRUGIMI OSEBAMI, TER POŠKODBE DRUGE LASTNINE IN RAZVELJAVITE KAKRŠNO KOLI JAMSTVO, KI VELJA ZA IZDELKE.

ILLUMINA NE PREVZEMA NOBENE ODGOVORNOSTI ZA NEPRAVILNO UPORABO IZDELKOV, OPISANIH V TEM DOKUMENTU (VKLJUČNO Z NJIHOVIMI DELI IN PROGRAMSKO OPREMO).

© 2023 Illumina, Inc. Vse pravice so pridržane.

Vse blagovne znamke so last družbe Illumina, Inc. ali njihovih ustreznih lastnikov. Za informacije o določenih blagovnih znamkah glejte spletno mesto www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktne podatke



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 ZDA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (zunaj Severne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponzor za Avstralijo

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

Označevanje izdelka

Za popolno referenco simbolov, ki so prikazani na embalaži in označevanju izdelka, glejte razlago simbolov na spletnem mestu support.illumina.com na zavihku *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.