

Леток на пакетот

ЗА IN VITRO ДИЈАГНОСТИЧКА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗВОЗ.

Каталошки бр. 20005715

Предвидена употреба

Инструментот NextSeq 550Dx е предвиден за секвенцирање на ДНК-збирки кога се користи со *in vitro* дијагностичка анализа. Инструментот NextSeq 550Dx е наменет за користење со конкретни, сертифицирани или одобрени *in vitro* дијагностички реагенси и аналитички софтвер.

Принципи на процедурата

Инструментот Illumina NextSeq 550Dx е наменет за секвенцирање ДНК-збирки со *in vitro* дијагностички анализи и е наменет за користење од страна на квалификуван и обучен персонал во клиничка лабораторија, обучен за користење на процедурите за *in vitro* дијагностика што се извршуваат во клиничката лабораторија. За внесување, NextSeq 550Dx користи збирки генерирани од ДНК, при што индексите на примероците и секвенците на снимање се додаваат на засилените цели. Збирките примероци се снимаат на проточна ќелија и се секвенцираат на инструментот со секвенцирање со хемиска синтеза (SBS). Хемиската SBS користи метод на реверзибилно прекинување за да открие флуоресцентно означени бази со еден нуклеотид, како што се инкорпорирани во фазите на ДНК. Софтверот Real-Time Analysis (RTA) извршува анализа на снимките и назначување бази и доделува резултати за квалитет за секоја база за секој циклус на секвенцирање. Кога ќе заврши примарната анализа, на инструментот може да се спроведе второстепена анализа за да се обработат назначените бази. NextSeq 550Dx користи различни модули за второстепена анализа, во зависност од работниот тек. За Germline или Somatic Variant Modules, обработката вклучува демултиплексирање, генерирање FASTQ-датотека, порамнување, назначување варијанти и генерирање датотеки во формат за назначување варијанти (VCF и gVCF). VCF и gVCF-датотеките содржат информации за варијантите откриени на одредени положби во референтниот геном.

Конфигурација за двојно стартување

NextSeq 550Dx содржи конфигурација за двојно стартување за да се овозможи користење на инструментот или во дијагностичкиот (Dx) или само во истражувачкиот (RUO) режим. Анализите за *In vitro* дијагностичко секвенцирање, вклучувајќи ги модулите Germline и Somatic Variant, се извршуваат во дијагностичкиот режим. Само реагенсите за IVD-секвенцирање може да се користат во дијагностичкиот режим. Карактеристиките на изведбата и ограничувањата на процедурата за инструментот NextSeq 550Dx се утврдуваат со модулите Germline и Somatic Variant во дијагностичкиот режим.

Ограничувања на процедурата

1. За *in vitro* дијагностичка употреба.
2. Germline и Somatic Variant Modules, кога се користат со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) или NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), можат да испорачаат:
 - Резултат од секвенцирање ≥ 90 гигабази (Gb)
 - Должина на исчитувања (во извршувања со спарен крај) 2 x 150 парови бази (bp)
 - Базите еднакви на или повеќе од Q30 ≥ 75 % при должина на исчитување од 2 x 150 bp
Базите еднакви на или повеќе од 75 % имаат резултати за квалитет на скалата на Phred ≥ 30 , што укажува на прецизност на назначување бази поголема од 99,9 %
3. Исчитувањата со индели (вметнувања, бришења или комбинации) во коишто содржината е > 25 bp не се порамнети од страна на софтверот за анализа. Поради тоа, софтверот за анализа не може да ги открие инделите со должина > 25 bp.
4. Софтверот со анализа можеби нема да ги порамни исчитаните ампликони со екстремните варијанти, што значи дека регионот ќе се пријави како непредвидлив. Таквите екстремни варијанти вклучуваат:
 - Исчитувања што содржат повеќе од три индели
 - Исчитувања со должина од најмалку 30 bp со варијанта со еден нуклеотид (SNV) > 4 % од вкупната целна должина на ампликонот (без регионите за сондирање)
 - Исчитувања со должина < 30 bp со SNV > 10 % од вкупната целна должина на ампликонот (со регионите за сондирање)
5. Големите варијанти, вклучувајќи ги мултинуклеотидните варијанти (MNV, multinucleotide variants) и големите индели, може да се пријават како посебни помали варијанти во VCF-датотеката со резултати.
6. Варијантите за бришење може да се филтрираат или да се испуштат кога се распоредени на два ампликони со плочки, ако должината на бришењето е поголема од или еднаква на преклопувањето помеѓу ампликоните со плочки.
7. Системот не може да открива индели ако се појават директно до прајмерот и ако нема ампликони што се преклопуваат. За регионите со ампликони што се преклопуваат, анализата не може да открива бришења кога регионот на преклопување е помал од големината на бришење што треба да се открие. На пример, ако регионот на преклопување помеѓу двата соседни ампликони е две бази, анализата не може да открие бришења, вклучувајќи ги тие две бази. Бришењето на една база на која било од тие бази може да се открие.
8. Каков што е случајот со секој работен тек за подготовка на збирка заснована на хибридизација, основните полиморфизми, мутациите, вметнувањата или бришењата на регионите за врзување со олигонуклеотиди може да влијаат врз алелите што се сондираат и назначувањата што се прават за време на секвенцирањето. На пример:
 - Варијанта во фазата со варијанта во регионот за прајмер може да не се засили, што ќе доведе до лажно негативен резултат.

- Варијантите во регионот за прајмер може да го спречи засилувањето на референтната алела, што ќе доведе до неточно назначување хомозиготна варијанта.
 - Варијантите на индели во регионот за прајмер може да предизвикаат лажно позитивно назначување на крајот од исчитувањето до прајмерот.
9. Инделите може да се филтрираат поради пристрасноста на фазите ако се појават во близина на крајот на едно исчитување и ако меко се отсечат за време на порамнувањето.
10. Малите MNV не се проверени и се пријавуваат само во Somatic Variant Module.
11. Бришењата се пријавуваат во VCF на координатата за претходната база во VCF-форматот. Затоа, земете ги предвид соседните варијанти пред да пријавите дека поединечно назначување база е хомозиготна референца.
12. Ограничувања за линија на микроби:
- Инструментот NextSeq 550Dx, со Local Run Manager Germline Variant Module за NextSeq 550Dx, е создаден за да испорача квалитативни резултати за назначувањето варијанти за линија на микроби (на пр., хомозиготни, хетерозиготни, непредвидливи).
 - Кога се користи со Germline Variant Module, минималната покриеност по ампликон потребна за прецизно назначување варијанта е 150x. Како резултат на тоа, потребни се 150 фрагменти што поддржуваат ДНК, што е еквивалентно на 300 исчитувања со спарен крај што се преклопуваат. Бројот на примероци и вкупниот број на целни бази влијаат врз покриеноста. GC-содржината и другите геномски содржини може да влијаат врз покриеноста.
 - Варијацијата во бројот на копии може да влијае врз тоа дали варијантата ќе се идентификува како хомозиготна или хетерозиготна.
 - Варијантите во одредени повторливи контексти се филтрираат во VCF-датотеките. Филтерот за повторување на RmN се користи за филтрирање на варијантите ако целата или дел од секвенцата со варијанта се повторува во референтниот геном до позицијата на варијантата. За назначувањето варијанта за линија на микроби, потребни се најмалку девет повторувања во референцата за да се филтрира варијантата. Се земаат предвид само повторувањата со должина од најмногу 5 bp (R5x9).
 - Инделот и SNV на еден локус може да доведат до пријавување на само една варијанта.
13. Соматски ограничувања.
- Инструментот NextSeq 550Dx, со Local Run Manager Somatic Variant Module за NextSeq 550Dx, е создаден за да испорача квалитативни резултати за назначувањето соматски варијанти (на пр., присуство на соматска варијанта со варијантна фреквенција поголема од или еднаква на 0.026, со граница на откривање од 0,05).
 - Кога се користи Somatic Variant Module, минималната покриеност по ампликон потребна за прецизно назначување варијанта е 450x по олигонуклеотидна група. Како резултат на тоа, потребни се 450 фрагменти што поддржуваат ДНК по олигонуклеотидна група, што е

еквивалентно на 900 исчитувања со спарен крај што се преклопуваат. Бојот на примероци и вкупниот бој на целни бази влијаат врз покриеноста. GC-содржината и другите геномски содржини може да влијаат врз покриеноста.

- За назначувањето соматска варијанта, потребни се најмалку шест повторувања во референцата за да се филтрира варијантата, а предвид се земаат само повторувањата со должина од најмногу 3 bp (R3x6).
- Somatic Variant Module не разликува помеѓу варијанти за линија на микроби и соматски варијанти. Модулот е создаден за откривање варијанти во различни опсези на варијантни фреквенции, но варијантната фреквенција не може да се користи за разликување на соматските варијанти од варијантите за линија на микроби.
- Нормалното ткиво во примероците влијае врз откривањето на варијантите. Пријавената граница на откривање се заснова на варијантната фреквенција, во однос на вкупната ДНК извлечена од ткивото со тумор и нормалното ткиво.

Компоненти на производот

Illumina NextSeq 550Dx се состои од следново:

1. Инструмент NextSeq 550Dx (каталожки бр. 20005715)
2. Софтверски компоненти за инструментот NextSeq 550Dx, вклучувајќи ги следниве:

Софтверска апликација	Функција	Опис
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Ја контролира работата на инструментот	Софтверската апликација NOS управува со работата на инструментот за време на секвенцирањето и генерира снимки што ги користи софтверот Real-Time Analysis (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Извршува примарна анализа	Софтверската апликација RTA ги претвора снимките што ги генерира NOS за секоја плочка во циклусот од извршувањето за секвенцирање во датотеки за назначување бази, коишто се внесуваат во модулите за анализа на Local Run Manager. Софтверската апликација RTA не содржи кориснички интерфејс.
Local Run Manager	Интерфејс за избирање модули	Софтверот Local Run Manager е решение интегрирано на инструментот управување со корисници, избирање на соодветниот модул за анализа и статус на надгледување.

Софтверска апликација	Функција	Опис
Somatic Variant Module	Извршува второстепена анализа	Софтверот на модулот за анализа на Local Run Manager го обработува назначувањето бази преку второстепена анализа. Обработката вклучува демултиплексирање, генерирање FASTQ-датотеки, порамнување, назначување варијанти и пријавување. Уредот за назначување варијанти (Pisces) генерира VCF-датотеки што содржат информации за варијантите откриени на специфични позиции во референтниот геном и ја содржи измерената фреквенција на варијанти.
Germline Variant Module	Извршува второстепена анализа	Софтверот на модулот за анализа на Local Run Manager го обработува назначувањето бази преку второстепена анализа. Обработката вклучува демултиплексирање, генерирање FASTQ-датотеки, порамнување, назначување варијанти и пријавување. Уредот за назначување варијанти (Pisces) генерира VCF-датотеки што содржат информации за варијантите откриени на специфични позиции во референтниот геном и ја идентификува секоја варијанта како хетерозиготна или хомозиготна.

3. Изборен Illumina DRAGEN сервер за NextSeq 550Dx (каталожки бр. 20086130), вклучувајќи ја следнава софтверска компонента:

Софтверска апликација	Функција	Опис
Illumina Run Manager	Интерфејс за избирање модули на апликацијата	Софтверот Illumina Run Manager е инсталиран на изборниот сервер DRAGEN, што е надвор од инструментот. Illumina Run Manager овозможува управување со корисниците, избирање модул за анализа и надгледување на извршувањето за секвенцирање и статусот на анализата.

Изборниот Illumina DRAGEN сервер за NextSeq 550Dx е достапен само во одредени држави. Контактирајте со застапник на Illumina за регионална достапност.

Работни услови

За повеќе информации за работните услови, погледнете го делот Еколошки совети во *NextSeq 550Dx Instrument Site Prep Guide (Водич за подготовка на локацијата на инструментот NextSeq 550Dx) (бр. на документ 1000000009869)*.

Елемент	Спецификација
Температура	Одржувајте температура од 19 °C до 25 °C (22 °C ±3 °C) во лабораторијата. Оваа температура е работна температура на инструментот. За време на извршувањето, не дозволувајте амбиенталната температура да варира повеќе од ±2 °C.
Влажност	Одржувајте релативна влажност помеѓу 20 – 80 %, без кондензација.

Најновите безбедносни упатства, предупредувања и информации за системите на Illumina може да ги најдете во [Безбедност и мрежи](#).

Опрема и материјали

Потребни опрема и материјали што се продаваат засебно

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles), каталожки бр. 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), каталожки бр. 20028871

Потребни опрема и материјали што не се обезбедени

Потрошни материјали што ги обезбедува корисникот за извршувања за секвенцирање

Потрошен материјал	Добавувач	Намена
Марамчиња со алкохол, 70 % изопропил или етанол, 70 %	VWR, каталожки бр. 95041-714 (или еквивалент) Генерален лабораториски добавувач	Чистење на проточната ќелија и општа употреба
Лабораториско марамче, со малку влакна	VWR, каталожки бр. 21905-026 (или еквивалент)	Чистење на проточната ќелија и општа употреба

Потрошни материјали што ги обезбедува корисникот за одржување на инструментот

Потрошен материјал	Добавувач	Намена
NaOCl, 5 % (натриум хипохлорит)	Sigma-Aldrich, каталожки бр. 239305 (или еквивалент на лабораториско ниво)	Промивање на инструментот со рачното промивање по извршувањето; разредено до 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, каталожки бр. P7949	Промивање на инструментот со опциите за рачно промивање; разредено до 0,05 %
Вода, на лабораториско ниво	Генерален лабораториски добавувач	Промивање на инструментот (рачно промивање)
Филтер за воздух	Illumina, каталожки бр. 20063988	Чистење на воздухот што инструментот го прима за разладување

Упатство за вода на лабораториско ниво

Секогаш користете вода на лабораториско ниво или дејонизирана вода за извршување на процедурите со инструментот. Никогаш не користете вода од чешма. Користете само вода на следниве нивоа или нивни еквиваленти:

- Дејонизирана вода
- Illumina PW1
- Вода од 18 мегаоми (MΩ)
- Вода Milli-Q
- Вода Super-Q
- Вода на ниво на молекуларна биологија

Предупредувања и мерки на претпазливост



ВНИМАНИЕ

Сојузните закони ја ограничуваат продажбата на уредов од страна на или по налог на лекар или друго медицинско лице лиценцирано со законот на Државата во којашто работи, за користење или препишување на уредот.

1. Некои компоненти на реагенсите обезбедени од Illumina за користење со инструментот NextSeq 550Dx содржат потенцијално опасни хемикалии. Може да настанат лични повреди преку вдишување, голтање, контакт со кожата и контакт со очите. Носете заштитна опрема, вклучувајќи опрема за очи, ракавици и лабораториски мантил, соодветни за ризикот од изложеност. Ракувајте со искористените реагенси како со хемиски отпад и фрлете ги согласно со соодветните регионални, државни и локални закони и прописи. За дополнителни еколошки, здравствени и безбедносни информации, погледнете го листот со безбедносни податоци (SDS, Safety Data Sheet) на support.illumina.com/sds.html.
2. Ракувајте со сите примероци од крв како да е докажано дека го содржат вирусот причинител на имунитетски недостаток кај човекот (HIV), вирусот хепатит Б (HBV) и други патогени агенси што се пренесуваат преку крв (универзални мерки на претпазливост).
3. Непридржувањето до предвидените процедури може да доведе до погрешни резултати или значително намалување на квалитетот на примероците.
4. Применувајте ги рутинските лабораториски мерки на претпазливост. Не вршете пипетирање со уста. Не јадете, не пијте и не пушете во назначените работни области. Носете ракавици за еднократна употреба и лабораториски мантили кога ракувате со примероците и комплетите реагенси. Темелно мијте ги рацете по ракувањето со примероците и комплетите реагенси.
5. Соодветните лабораториски практики и добрата лабораториска хигиена се задолжителни за да се спречи PCR-производите да ги контаминираат реагенсите, инструментите и геномски ДНК-примероци. Контаминацијата на PCR може да предизвика неточни и неверојливи резултати.
6. За да се спречи контаминација, погрижете се областите за предзасилување и постзасилување да имаат соодветна опрема и потрошни материјали (на пр., пипети, врвови за пипети, топлински блокови, мешалки и центрифуги).
7. Спарувањето на индексите и примероците мора точно да одговара на отпечатениот распоред на плочата. Local Run Manager автоматски ги пополнува прајмерите за индексирање поврзани со имињата на примероците, кога ќе се внесе во модулот. На корисникот му се препорачува да ги потврди прајмерите за индексирање поврзани со примероците пред да го започне извршувањето за секвенцирање. Разликите помеѓу примерокот и распоредот на плочата ќе доведат до губење на позитивната идентификација на примероците и пријавување неточни резултати.
8. Силно се препорачува инсталирање софтвер против вируси обезбеден од корисникот за заштита на компјутерот од вируси. Консултирајте се со корисничкиот прирачник за упатство за инсталирање.
9. Не ракувајте со NextSeq 550Dx кога некој од панелите е отстранет. Ракувањето со инструментот кога кој било од панелите е отстранет создава потенцијална изложеност на линиски напон и напон на директна струја.
10. Не допирајте ја платформата на проточната ќелија во одделот за проточна ќелија. Грејачот во овој оддел работи на температура помеѓу 22 °C и 95 °C и може да предизвика изгореници.
11. Инструментот тежи приближно 185 фунти и може да предизвика сериозни повреди ако се испушти или ако со него се ракува на несоодветен начин.

12. Illumina ја препознава постојаната потреба за управување со законите за компјутерската безбедност; најновите безбедносни упатства, предупредувања и информации за системите на Illumina може да ги најдете во [Безбедност и мрежи](#).

Упатство за употреба

Следново упатство за употреба на инструментот NextSeq 550Dx ги бара реагенсите наведени во NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) или NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).

Создавање извршување

Создајте извршување за секвенцирање со Local Run Manager или Illumina Run Manager. Упатството за користење на Local Run Manager е наведено подолу и во NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Референтен водич за инструментот NextSeq 550Dx) (бр. на документ 1000000009513). За упатство за начинот на создавање извршување со Illumina Run Manager, разгледајте Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Software Guide (Водич за софтверот на Illumina Run Manager за NextSeq 550Dx) (бр. на документ 200025239).

За упатство за избирање помеѓу Local Run Manager и Illumina Run Manager, погледнете го Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Software Guide (Водичот за софтверот на Illumina Run Manager за NextSeq 550Dx) (бр. на документ 200025239). За детално упатство за конкретни апликации, погледнете го водичот за модулот или апликацијата за конкретната анализа.

Следново упатство важи за користењето на модулите Germline и Somatic Variant на Local Run Manager.

Поставување параметри

1. Најавете се на Local Run Manager.
2. Изберете **Create Run** (Создај извршување) и изберете **Somatic Variant** (Соматска варијанта) или **Germline Variant** (Варијанта од линија на микроби).
3. Внесете име на извршувањето што ќе го идентификува извршувањето од секвенцирањето до анализата.
Користете алфанумерички знаци, празни места, долни црти или цртички.
4. [Изборно] Внесете опис на извршувањето за полесно идентификување на извршувањето.
Користете алфанумерички знаци, празни места, долни црти или цртички.
5. Изберете го бројот на примероци и комплетот индекси од паѓачкиот список.
Земете ги предвид следниве информации кога избирате.
 - Паѓачкиот список содржи броеви и примероци и комплет индекси. На пример, 24-Set 1 (24-Комплет 1) укажува дека ќе се тестираат 24 примероци, со индекси од комплетот индекси 1.

- Броевите на комплетот индекси се однесуваат на различни комплекти од паровите на индекси i5 и i7. И Set 1 (Комплет 1) и Set 2 (Комплет 2) нудат разновидност на индекси. Понудени се два комплекта индекси за да се спречи исцрпувањето на еден комплет.
- Изберете го бројот на примероци што е најблиску до бројот на примероци што ги тестирате. Ако точниот број на примероци го нема на списокот, изберете го бројот што е најблиску, но е помал од бројот што го тестирате. На пример, ако сакате да тестирате 18 примероци, изберете 16 примероци.
- Предложените бунарчиња на примероци и комбинации на индекси што ги исполнуваат условите за разновидност на индекси се нагласени со зелена боја.

Увезување манифестни датотеки за извршувањето

1. Погрижете се потребните манифести за увезување да бидат достапни на пристапна мрежна локација или на USB-диск.
2. Изберете **Import Manifests** (Увези манифести).
3. Појдете до манифестната датотека и изберете ги манифестите што сакате да ги додадете.

ЗАБЕЛЕШКА За манифестните датотеки да бидат достапни за сите извршувања со модулот за анализа Germline Variant или Somatic Variant, додајте манифести со функцијата Module Settings (Поставки за модулите). За оваа функција се потребни дозволи на ниво на администратор. За повеќе информации, погледнете го *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Референтен водич за инструментот NextSeq 550Dx)* (бр. на документ 1000000009513).

Наведете примероци за извршувањето

Наведете примероци за извршувањето со една од опциите и насоките што следуваат.


Enter samples manually (Рачно внесување примероци) – користете ја празната табела на екранот Create Run (Создај извршување).

Import samples (Увезување примероци) – појдете до надворешна датотека во формат со вредности разделени со запирка (*.csv). На екранот Create Run (Создавање извршување) е достапен шаблон за преземање.


Рачно внесување примероци

1. Внесете уникатно име на примерок (*модул за анализа Somatic Variant*) или ИД на примерок (*модул за анализа Germline Variant*).
Користете алфанумерички знаци, црточички или долни црти.
2. [Изборно] За позитивните или негативните контролни примероци, кликнете со десното копче и изберете го типот контрола.

Контролата во едно бунарче на примероци автоматски го пополнува соодветното бунарче во другата група со истата контрола.

3. [Изборно] Внесете опис на примерокот во полето Sample Description (Опис на примерокот). Користете алфанумерички знаци, цртички или долни црти.
4. Изберете го адаптерот за индексирање 1 од паѓачкиот список Индекс 1 (i7). Кога ги користите предложените бунарчиња на примероци, софтверот автоматски ги пополнува адаптерите за индексирање i7 и i5 што ги исполнуваат условите за разновидност на индекси. Ако точниот број на примероци што ги тестираате го нема на списокот, изберете адаптери за индексирање за дополнителни бунарчиња.
5. Изберете го адаптерот за индексирање 2 од паѓачкиот список Индекс 2 (i5).
6. Изберете манифестна датотека од паѓачкиот список Manifest (Манифест). За примероците од групата А е потребен различен манифест од тој за примероците во групата Б.
7. Изберете опција за прикажување, печатење или зачувување на распоредот на плочата како референца за подготвување на збирките:
 - Изберете ја иконата  **Print** (Отпечати) за да се прикаже распоредот на плочата. Изберете **Print** (Отпечати) за да се отпечати распоредот на плочата.
 - Изберете **Export** (Извези) за да ги извезете информациите за примерокот во надворешна датотека.
8. Изберете **Save Run** (Зачувај го извршувањето).

Увезување примероци

1. Изберете **Import Samples** (Увезување примероци) и појдете до локацијата на датотеката со информации за примероците. Постојат два типа датотеки што може да ги увезете.
 - Изберете **Template** (Шаблон) на екранот Create Run (Создај извршување) за да создадете нов распоред на плоча. Датотеката за шаблонот ги содржи точните наслови на колони за увезување. Внесете ги информациите за примероците во секоја колона за примероците од извршувањето. Избришете ги информациите за пример во неискористените ќелии, па зачувајте ја датотеката.
 - Користете датотека со информации за примероците извезена од модулот Germline Variant или Somatic Variant со функцијата Export (Извези).
2. Изберете ја иконата  **Print** (Отпечати) за да се прикаже распоредот на плочата.
3. Изберете **Print** (Отпечати) за да го отпечатите распоредот на плочата како референца за подготвување на збирките.
4. Изберете **Save Run** (Зачувај го извршувањето).

Подготвување на патронот со реагенси

Внимателно следете ги насоките за патронот со реагенси за успешно секвенцирање.

1. Отстранете го патронот со реагенси од каде што е складиран на температура од -25 °C до -15 °C.

- Изберете еден од следниве методи за одмрзнување на реагенсите. Не потопувајте го патронот. Откако ќе се одмрзне патронот, исушете го пред да продолжите на следниот чекор.

Температура	Време на одмрзнување	Ограничување на стабилноста
Водена бања со температура од 15 °C до 30 °C	60 минути	Да не се надминуваат 6 часа
На температура од 2 °C до 8 °C	7 часа	Да не се надминуваат 5 дена

ЗАБЕЛЕШКА Ако во истата водена бања се одмрзнува повеќе од еден патрон, продолжете го времето на одмрзнување.

- Превртете го патронот петпати за да ги измешате реагенсите.
- Проверете го дното на патронот за да се осигурите дека реагенсите се одмрзнати и дека нема талог. Потврдете дека позициите 29, 30, 31 и 32 се одмрзнати, бидејќи тие се најголеми и за нив е потребно најмногу време за да се одмрзнат.
- Нежно потчукнете ја рамката за да ги намалите воздушните меурчиња. За најдобри резултати, веднаш внесете го примерокот и поставете го извршувањето.

Подготвување на проточната ќелија

- Отстранете ја кутијата со нова проточна ќелија од каде што е складирана на температура од 2 °C до 8 °C.
- Отстранете ја фолијата за пакување од кутијата и оставете ја на собна температура 30 минути.

Подготвување на збирките за секвенцирање

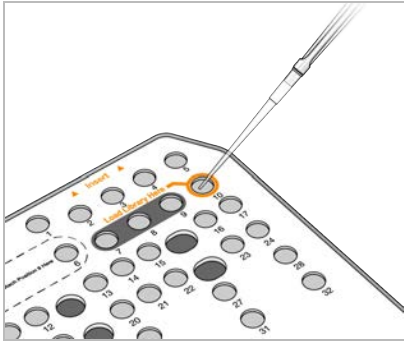
Извршете денатурирање и разредување на збирките до количина за внесување од 1,3 ml. Практично, концентрацијата за внесување може да се разликува, во зависност од подготовката на збирката и методите на квантификација. Разредувањето на збирките со примероци зависи од комплексноста на олигонуклеотидните групи. За насоки за подготвување на збирките со примероци за секвенцирање, вклучувајќи го разредувањето и групирањето на збирките, разгледајте го делот Упатство за употреба за соодветниот комплет за подготвување збирки. Потребно е оптимизирање на густината на кластерите на NextSeq 550Dx.

Вметнување збирки во патронот со реагенси

- Исчистете го печатот на фолијата што го покрива резервоарот бр. 10 означен со **Load Library Here** (Вметнете збирка тука) со марамче со малку влакна.
- Продупчете го печатот со чист врв на пипета од 1 ml.

3. Вметнете 1,3 ml од подготвените збирки во резервоарот бр. 10 означен со **Load Library Here** (Вметнете збирка тука). Избегнувајте допирање на печатот на фолијата додека ги внесувате збирките.

Слика 1 Вметнување на збирките



Поставување извршување за секвенцирање

Разгледајте го NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Референтен водич за инструментот NextSeq 550Dx) (бр. на документ 100000009513) за целосно упатство за поставување на извршувањето.

1. Најавете се на NextSeq 550Dx со лозинката за софтверот Local Run Manager или Illumina Run Manager.
2. Од почетниот екран на софтверот NOS, изберете **Sequence** (Секвенцирај).
3. Изберете извршување од списокот, па изберете **Next** (Следно).

Ќе се отворат серија екрани за поставување извршување по следниов редослед: Load Flow Cell (Вметнување проточна ќелија), Load Buffer Cartridge (Вметнување патрон со пуфер), Load Reagent Cartridge (Вметнување патрон со реагенси) и Pre-run Check (Проверка пред извршување).

ЗАБЕЛЕШКА До извршувањата може да се пристапи само со истиот Run Manager што се користел за планирање на извршувањето. За упатство за начинот на поставување на софтверот на Run Manager, разгледајте Illumina Run Manager for NextSeq 550Dx Software Guide (Водич за софтверот на Illumina Run Manager за NextSeq 550Dx) (бр. на документ 200025239).

4. Кога ќе се појави екранот Load Flow Cell (Вметнување проточна ќелија), исчистете ја, па вметнете ја проточната ќелија.
 - Отстранете ја проточната ќелија од фолијата во којашто е спакувана.
 - Отворете го просирното пластично пакување и отстранете ја проточната ќелија
 - Исчистете ја стаклената површина на проточната ќелија со марамче без влакненца со алкохол. Исушете го стаклото со суво лабораториско марамче со малку влакненца
 - Погрижете се стаклената површина на проточната ќелија да биде чиста. Ако е потребно, повторете го чекорот за чистење.

- Отстранете ја искористената проточна ќелија од претходното извршување.
 - Поставете ја проточната ќелија врз иглите за порамнување и ставете ја проточната ќелија на платформата.
5. Изберете **Load** (Вметни).
Вратата се затвора автоматски, ИД на проточната ќелија се појавува на екранот и се проверуваат сензорите.
 6. Следете ги советите од софтверот за празнење на садот за потрошени реагенси, вметнете го патронот со пуфер на NextSeq 550Dx и вметнете го патронот со реагенси на NextSeq 550Dx.
Кога ќе се вметнат патроните со пуфер и реагенси на NextSeq 550Dx, софтверот ќе го прочита и ќе го евидентира RFID. ИД на патронот со пуфер и патронот со реагенси се појавуваат на екранот и се проверуваат сензорите.
 7. Кога ќе заврши автоматската проверка пред извршувањето, изберете **Start** (Започни). (Не е потребно ако е конфигурирана да започне автоматски.)
 8. Екранот Sequencing (Секвенцирање) се отвора кога ќе започне извршувањето. Овој екран дава визуелен приказ на извршувањето што е во тек, вклучувајќи ги интензитетите и резултатите за квалитет (Q-резултати).

Резултати

Софтверот Real-Time Analysis (RTA) е интегриран софтвер што извршува анализа на снимките и назначување бази и доделува резултати за квалитет за секоја база за секој циклус на секвенцирање. Кога ќе заврши примарната анализа, избраниот модул на апликацијата автоматски започнува второстепена анализа. Процесите за второстепена анализа опишани тука се за Local Run Manager Germline и Somatic Variant Modules на инструментот NextSeq 550Dx.

Демултиплексирање

Демултиплексирањето ја споредува секоја секвенца на Index Read (Исчитување индекси) со секвенците за индексирање наведени за извршувањето. За овој чекор не се земаат предвид никакви вредности за квалитет.

Исчитувањата индекси се идентификуваат со следниве чекори:

- Примерците се нумерирани почнувајќи од 1 според редоследот по којшто се наведени за извршувањето.
- Примерокот број 0 е резервиран за кластерите што не се назначени за примерок.
- Кластерите се назначуваат за примерок кога секвенцата за индексирање точно одговара на или кога има најмногу една разлика по Index Read (Исчитување индекси).

Генерирање FASTQ-датотека

По демултиплексирањето, софтверот генерира датотеки за посредна анализа во FASTQ-формат, односно текстуален формат што се користи за претставување на секвенците. FASTQ-датотеките содржат исчитувања за секој примерок и поврзаните резултати за квалитет. Кластерите што не поминуваат низ филтерот се исклучуваат.

Секоја FASTQ-датотека содржи исчитувања за само еден примерок, а името на тој примерок се вклучува во името на FASTQ-датотеката. Во модулите Germline и Somatic Variant, се генерираат осум FASTQ-датотеки по примерок за олиго-група, четири од исчитувањето 1 и четири од исчитувањето 2. Ова дава резултати во вкупно 8 и 16 FASTQ-датотеки по примерок за Germline и Somatic, по тој редослед. FASTQ-датотеките се примарен материјал за порамнување.

Порамнување

За време на чекорот за порамнување, појасниот Smith-Waterman алгоритам ги порамнува кластерите од секој примерок во однос на ампликонските секвенци наведени во манифестната датотека.

Појасниот Smith-Waterman алгоритам извршува полуглобални порамнувања на секвенците за да се утврдат слични региони помеѓу двете секвенци. Наместо да ја споредува целата секвенца, Smith-Waterman алгоритмот ги споредува сегментите со сите можни должини.

Секое исчитување со спарен крај се проценува во однос на порамнувањето со релевантните секвенци за сондирање за тоа извршување.

- Исчитувањето 1 се проценува во однос на обратниот дел од Downstream Locus-Specific Oligos (DLSO).
- Исчитувањето 2 се проценува во однос на Upstream Locus-Specific Oligos (ULSO).
- Ако почетокот на исчитувањето одговара на секвенца за сондирање со не повеќе од една разлика, целата должина на исчитувањето се порамнува со целта на ампликонот за таа секвенца.
- Ако почетокот на исчитувањето одговара на секвенца за сондирање со не повеќе од три разлики (разлики или поместувања поради водечките индели), целата должина на исчитувањето се порамнува со целта на ампликонот за таа секвенца.
- Инделите во рамките на DLSO и ULSO не се разгледуваат поради хемиската анализа.

Порамнувањата се филтрираат од резултатите за порамнување според стапките на разлики или во регионот на интерес или во целиот ампликон, во зависност од должината на ампликонот. Филтрираните порамнувања се впишуваат во датотеките за порамнување како непорамнети и не се користат при назначувањето варијанти.

Назначување варијанти

Уредот за назначување варијанти Pisces е создаден за назначување варијанти на SNV и индели од збирките подготвени за инструментот.

Извештаи и дополнителни датотеки со резултати

Модулите за анализа на варијанти даваат PDF-извештаи и текстуални (*.txt) извештаи што ги прикажуваат мерењата, како длабочина на секвенцирање и број на варијанти. Модулите даваат и датотеки со резултати како VCF и формат за назначување варијанта на геномот (gVCF, genome Variant Call Format) датотеки за апликациите за назначување варијанти.

Процедури за контрола на квалитетот

Софтверот на NextSeq 550Dx го проценува секое извршување, примерок и назначување бази во однос на мерењата за контрола на квалитетот. Позитивните и негативните контроли се препорачуваат и при подготовката на збирки и треба да се проценат. Проценете ги контролите на следниов начин:

- **Negative Control (No Template Control) or other negative control** (Негативна контрола (без контрола за шаблон) или друга негативна контрола) – мора да го генерира очекуваниот резултат. Ако негативната контрола генерира резултат што е различен од очекуваниот, тогаш дошло до можна грешка во следењето на примерокот, неточно евидентирање во прајмерите за индексирање или контаминација.
- **Positive Control Sample** (Примерок со позитивна контрола) – мора да го генерира очекуваниот резултат. Ако позитивната контрола генерира резултат што е различен од очекуваниот, тогаш дошло до можна грешка во следењето на примерокот или неточно евидентирање во прајмерите за индексирање.

Карактеристики на изведбата

Карактеристиките на изведбата за инструментот NextSeq 550Dx се утврдени со Germline и Somatic Variant Modules со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и се потврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Студиите опфатиле Индексирање на примероци, Пренесување примероци, ДНК-внес, Аналитичка чувствителност (граница на празно/граница на откривање), Точност, Прецизност, Споредба на методи и Репродуктивност.

Аналитичките студии со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) се создадени за проценка на тврдењата за изведбата што претходно се утврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Резултатите покажуваат дека комплетите реагенси (v2 и v2.5) имаат слична изведба со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Разгледајте го летокот на пакетот за *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* за карактеристики на изведбата поврзани со преданалитичките фактори, како методи на извлекување или супстанции кои го попречуваат процесот.

Дефиниции на пресметките што се користат во карактеристиките на изведбата

1. Договорот за позитивен процент (PPA, Positive Percent Agreement) се пресметува како пропорција на локуси класифицирани како варијанти со референтен метод што е точно пријавен од анализата.
 - $(\text{Бр. на локуси-варијанти точно пријавени од анализата}) / (\text{вкупниот бр. на локуси-варијанти})$
Локусите-варијанти пријавени од анализата што се усогласени со референтниот метод се вистински позитивни (TP, true positives). Локусите-варијанти пријавени како референтни назначувања или како различни назначени варијанти од анализата се лажно негативни (FN, false negatives).
2. Договорот за негативен процент (NPA, Negative Percent Agreement) се пресметува како пропорција на локуси класифицирани како непредвидливи со референтен метод што е точно пријавен од анализата.
 - $(\text{Бр. на непредвидливи локуси точно пријавени од анализата}) / (\text{вкупниот бр. на непредвидливи локуси})$
Непредвидливите локуси пријавени од анализата што се усогласени со референтниот метод се вистински негативни (TN, true negatives). Непредвидливите локуси пријавени како варијанти од низата се лажно позитивни (FP, false positives).
3. Договорот за целокупен процент (OPA, Overall percent agreement) се пресметува како пропорција на локуси точно пријавени од анализата во однос на референтен метод.
 - $((\text{Бр. на локуси-варијанти точно пријавени од анализата}) + (\text{бр. на непредвидливи локуси точно пријавени од анализата})) / ((\text{вкупниот бр. на локуси-варијанти}) + (\text{вкупниот бр. на непредвидливи локуси}))$
4. Пресметките на PPA, NPA и OPA не содржат неназначени резултати (локуси-варијанти или референтни локуси што не ги исполнуваат условите за еден или повеќе филтри за квалитет).
5. Стапката на автосомно назначување се пресметува како вкупен број на локуси што минуваат низ филтрите поделен со вкупниот број на положби секвенцирани за хромозомите 1 – 22; хромозомите X и Y се исклучени. Ова мерење не го зема предвид договорот за назначување со референтниот метод.

Изведба на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles)

Индексирање на примероци

Прајмерите за индексирање на примероци, што се додаваат за време на подготовката на збирката, назначуваат уникатна секвенца за секоја ДНК од примероците. Ваквите уникатни секвенци овозможуваат повеќе примероци да се групираат заедно во едно извршување за секвенцирање. Индексирањето на примероци се користи и за работниот тек за линија на микроби и за соматскиот

работен тек. Целта на оваа студија била да ги утврди минималниот (8) и максималниот (96) број на примероци што може да се обработат во едно извршување за секвенцирање на инструментот NextSeq 550Dx. Тестирани биле осум уникатни примероци на Platinum Genome со 12 различни комбинации на прајмер за индексирање по примерок. Резултатите за примероците од четири извршувања за секвенцирање со Germline Variant Module се споредени со верзијата на Platinum Genomes 2016-1.0.

За првата група извршувања, тестирани биле 96 уникатно индексирани збирки на примероци со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази по фаза во сите 23 човечки хромозоми, за да се потврди можноста на анализата за доследно назначување генотипизација за даден примерок во различни комбинации на прајмер за индексирање. За втората група извршувања, секвенцирани биле осум уникатно индексирани збирки на примероци во две извршувања за секвенцирање, за да се потврди минималниот број на поддржани индексирања.

За извршувањата со 96 индексирања, PPA за SNV е во опсег од 98,7 % до 100 %, PPA за вметнувањата и бришењата е 100 %, а NPA е 100 % за секоја од 96. комбинации на индексирање. Извршувањата со 8 индексирања имаат вредност за PPA од 100 % (SNV, вметнувања и бришења) и NPA од 100 % за секоја од осумте комбинации на индексирање.

Пренесување примероци

Инструментот NextSeq 550Dx овозможува секвенцирање на повеќе примероци плус контроли во едно извршување за секвенцирање. Спроведена е студија за проценување на степенот на пренесување примероци во рамките на извршувањето за секвенцирање (во едно извршување) и помеѓу извршувањата за секвенцирање (од едно во друго извршување). Два примероци на Platinum Genome, еден машки и еден женски, се тестирани со репрезентативна анализа создадена за испитување на различните гени што опфаќаат 12.588 бази (150 ампликони) во 23 различни хромозоми, вклучувајќи ги двата полови хромозоми. Збирките се секвенцирани на инструментот NextSeq 550Dx со Germline Variant Module. Пренесувањето на машки во женски примероци е забележано со присуството на исчитани ампликони на Y-хромозом во женските примероци.

Пренесувањето во едно извршување може да се забележи за време на генерирањето кластери, назначувањето бази во циклусот на индексирање и демултиплексирањето на примероците. За тестирање на пренесувањето примероци во едно извршување за секвенцирање, секвенцирана е група збирки што се состои од 46 реплики и од машките и од женските примероци плус четири контроли без шаблон еднаш на инструментот NextSeq 550Dx. Пренесувањето примероци во едно извршување е проценето со споредување на покриеноста на ампликони на Y-хромозом на секоја женска реплика со просечната покриеност на ампликони на Y-хромозом на сите машки реплики во групата. Средната вредност забележана за пренесувањето во едно извршување е 0,084 %.

За тестирање на пренесувањето примероци од едно во друго извршување, подготвени се и последователно се секвенцирани две групи збирки на еден инструмент NextSeq 550Dx. Првата група содржела 46 реплики од женски примероци плус две контроли без шаблон. Втората група содржела 46 реплики од машки примероци плус две контроли без шаблон. За обете групи се користела истата група адаптери за индексирање. Прво е секвенцирана женската група, по што е спроведено извршување за секвенцирање со машката група, па уште едно повторено извршување за секвенцирање на женската група. Пренесувањето примероци од едно во друго извршување е проценето со споредување на

покриеноста на ампликони на Y-хромозом помеѓу соодветните реплики од повтореното извршување за секвенцирање на женската група и извршувањето на машката група. Средната вредност забележана за пренесувањето од едно во друго извршување е 0,0076 %

ДНК-внес

Крв (линија на микроби)

Опсегот за внесување ДНК од крв за подготовката на збирка за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx со работниот тек Germline Variant Module е утврден за инструментот NextSeq 550Dx. Овој опсег е проценет со извршување студија со сериско разредување, со 13 примероци на Platinum Genome со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази во 23 различни хромозоми. Збирката е секвенцирана на два инструменти NextSeq 550Dx со една серија на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Пет примероци се тестирани во дупликати на пет нивоа на внесување ДНК во опсег од 250 ng до 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng и 12 ng). Осум примероци се тестирани како една реплика на секое од петте нивоа на внесување ДНК. За да се утврди прецизноста, примероците од генотипи се споредени со Platinum Genomes верзија 2016-1.0. Резултатите се утврдени за секое ниво на внесување. PPA за секој тип варијанта (SNV, вметнувања и бришења) е презентираан во [Табела 1](#); NPA е презентираан во [Табела 2](#). Сите нивоа на внесување имале слична прецизност. Препорачаниот ДНК-внес за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx е 50 ng со 25 ng и 100 ng, со што се овозможува долна и горна граница за исполнување на карактеристиките на изведбата.

Табела 1 Резултати за PPA за секој ДНК-внес според тип варијанта

ДНК-внес (ng)	Тип варијанта	Очекувани варијанти	TP	FN	Варијанта без назначувања	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	Вметнување	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	Бришење	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

Табела 2 NPA за секој ДНК-внес

ДНК-внес (ng)	TN	FP	Референца без назначувања	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 (соматски)

Опсегот за внесување ДНК фиксирана со формалин и вметната во парафин (FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded) за подготовката на збирка за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx со работниот тек Somatic Variant Module е утврден за инструментот NextSeq 550Dx. Опсегот на ДНК-внес е проценет со извршување студија со сериско разредување, со три примероци на Platinum Genome со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази во 23 различни хромозоми. Линиите со клетки од Platinum Genome GM12878 и GM12877 биле фиксирани со формалин и вметнати во парафин по извлекувањето на ДНК. GM12878 е разредена со GM12877, така што варијантните фреквенции на алели (VAF) со 79 варијанти (55 SNV, 9 вметнувања и 15 бришења) биле близу до 0,025, 0,05 или 0,10. Дополнително, секој примерок имал 91 варијанта со повисоки варијантни фреквенции од најмногу 1,0 VAF. Примероците се обработени во дупликати на пет нивоа за внесување ДНК со среден квантитативен циклус делта (dCq) од 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 и 7,8, измерено со TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Секоја збирка е секвенцирана на два инструменти NextSeq 550Dx со две серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). За да се утврди прецизноста, примероците од назначени варијанти се споредени со Platinum Genomes верзија 2016-1.0. PPA за секој тип варијанта (SNV, вметнувања и бришења) е презентираан во [Табела 3](#); NPA е презентираан во [Табела 4](#). Препорачаниот ДНК-внес за варијантите од 0,05 VAF или повисоко е dCq ≤ 4 со 4,6, со пониска граница за исполнување на карактеристиките на изведбата.

Табела 3 Резултати за PPA за секој ДНК-внес според тип варијанта

Среден dCq	Тип варијанта	Очекувани варијанти	Очекувано без назначувања	VAF на целното разредување					
				0,025		0,05		0,10	
				Варијанта без назначувања	PPA (%)	Варијанта без назначувања	PPA (%)	Варијанта без назначувања	PPA (%)
2,1	SNV	808	Не е применливо.	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	Вметнување	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	Бришење	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

Табела 4 NPA за секој ДНК-внес

Среден dCq	Очекуван непредвидлив тип	VAF на целното разредување					
		0,025		0,05		0,10	
		Референца без назначувања	NPA (%)	Референца без назначувања	NPA (%)	Референца без назначувања	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

Аналитичка чувствителност (граница на празно [LoB, Limit of Blank] и граница на откривање [LoD, Limit of Detection])

Оваа студија е спроведена за да се процената границата на празно (LoB) и границата на откривање (LoD) за Somatic Variant Module на инструментот NextSeq 550Dx. Тоа е извршено со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази во 23 различни хромозоми. Линиите

со клетки од Platinum Genome GM12878 и GM12877 биле фиксирани со формалин и вметнати во парафин по извлекувањето на ДНК. GM12878 е разредена со GM12877, така што варијантните фреквенции со 74 варијанти (53 SNV, 7 вметнувања и 14 бришења) биле $0,05 \pm 0,02$. GM12877 и разредената GM12878 (GM12878-D) се тестирани во текот на шест последователни почетни дена со еден инструмент, со наизменично менување на две серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), со вкупно шест извршувања за секвенцирање. Овој тест дал 60 реплики за секоја варијанта во GM12878-D и 72 реплики за секоја соодветна непредвидлива координата во GM12877 за секоја серија на реагенси. LoB и LoD се пресметани со класичниот пристап наведен во CLSI EP17-A2, со непараметриската опција. LoB и LoD се одделно пресметани во однос на SNV, вметнувања и бришења, со групирање на варијантните фреквенции за дадениот тип варијанта. Грешката од тип I е дефинирана како 0,01, а грешката од тип II е дефинирана како 0,05.

За LoB, групираниите варијантни фреквенции се сортирани од најниска до највисока и пресметана е позицијата од 99. ранг за секоја серија на реагенси за секој тип варијанта (Табела 5). Somatic Variant Module користи граница (ефективна LoB) од 0,026 VAF за утврдување на квалитативното откривање варијанти. Пресметаната LoB потврди дека оваа граница доведува до грешка од тип I не повисока од 0,01.

Табела 5 Граница на празно

Тип варијанта	Вкупно забележани резултати	Серија на реагенси за LoB 1 (%)	Серија на реагенси за LoB 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Вметнување	504	0,56	0,56
Бришење	1008	1,20	1,20

За LoD, се пресмета процентот на фреквенција на поединечни мутации за секоја серија на реагенси за секој тип варијанта под границата од 0,026 Табела 6. Процентите биле помали од грешката од тип II од 5 % (0,05), па средната вредност на комбинираниите варијантни фреквенции е пресметана како LoD (Табела 6). За LoD за секој тип варијанта е земена помалата од двете вредности пресметани за двете серии на реагенси – 4,97 % за SNV, 5,12 % за вметнувања и 5,26 % за бришења.

Табела 6 Граница на откривање

Серија на реагенси	Тип варијанта	Вкупно забележани резултати	Бр. на мерења за VAF < 2,6 %	% на мерења за VAF < 2,6 %	Граница на откривање (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Вметнување	420	6	1,4	5,08
	Бришење	840	7	0,8	5,22

2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Вметнување	420	5	1,2	5,12
	Бришење	840	7	0,80	5,26

Прецизност

Линија на микроби

Следнава студија е спроведена за да се процени прецизноста на назначувањето варијанти на Germline Variant Module на инструментот NextSeq 550Dx со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Тестирани се 13 уникатни примероци на Platinum Genome со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази (150 ампликони) во 23 различни хромозоми. Извршени се вкупно девет извршувања со три инструменти за секвенцирање, три серии на реагенси и три оператори во текот на пет почетни дена. Прецизноста е утврдена за SNV, вметнувања и бришења, со споредување на резултатите со јасно карактеризиран композитен референтен метод, верзија на Platinum Genomes 2016-1.0. Доверливите геномски региони се утврдени според овој референтен метод, освен ако е наведено поинаку.

Табела 7 Резиме на договорот за линија на микроби

Критериуми	Вкупно забележани резултати ¹	Резултат по забележан резултат ²	Резултат по извршување ³
PPA за SNV	819	98,7	>99,9
PPA за вметнувања	819	95,0	98,9
PPA за бришења	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Пресметано како број на примероци по извршување (91) x број на извршувања (9) = 819.

²Најниска забележана вредност по реплика на примерок во сите 9 извршувања.

³Најниска вредност кога податоците од секое извршување се анализирани во агрегат.

Табела 8 ги содржи податоците за студијата презентирани со договор за позитивен и негативен процент по примерок, при што резултатите од варијантите се споредени со верзијата на Platinum Genomes 2016-1.0 за пресметки на PPA. Трите типови варијанти (SNV, вметнувања и бришења) се комбинирани. Референтниот метод нуди резултати само за варијантите со еден нуклеотид и вметнувањата/бришењата, па резултатите со неваријантни бази се споредуваат со референтна секвенца за човечки геном верзија hg19 за пресметки на NPA.

Табела 8 Договор за линија на микроби по примерок

Примерок	Просечна стапка на назначување	Очекувани варијанти ¹	TP	FN	Варијанта без назначувања	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Вкупен број на варијанти во сите реплики на примероци во 9 извршувања.

Табела 9 ги содржи податоците за студијата презентирани по примерок, при што резултатите од варијантите се споредени со јасно карактеризиран композитен референтен метод. Откривањето е проценето за секој тип варијанта – SNV, вметнувања и бришења – засебно. Референтните положби се исклучени.

Табела 9 Договор за линија на микроби по примерок според тип варијанта

Примерок	SNV			Вметнувања			Бришења		
	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN	Очекувано	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

Примерок	SNV			Вметнувања			Бришења		
	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN
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

Примероците понатаму се анализирале за назначување мали вметнувања и бришења (индели). Целокупното резиме е презентирано во [Табела 10](#). Имало вкупно 71 индел во опсег на големина од 1 – 24 bp за вметнувања и 1 – 25 bp за бришења.

Табела 10 Резиме на откривањето индели за линија на микроби

Варијанта Тип	Очекувани варијанти	TP	FN	Варијанта без назначувања	PPA
Вметнување	18522	18018	27	477	99,9
Бришење	17388	17073	0	315	100

Репрезентативната анализа се состоела од 150 ампликони создадени да опфатат различни геномски содржини. GC-содржината на ампликоните била во опсег од 0,19 – 0,87. Ампликоните имале и опсег на повторувања од еден нуклеотид (на пр., PolyA, PolyT), динуклеотид и тринуклеотид. Податоците биле компилирани за по еден ампликон (Табела 11) за да се утврди ефектот на геномската содржина врз процентот на точни назначувања. Процентот на точни назначувања се состои од назначените варијанти и референци и е помал од 100 % ако има неточни назначувања или ако нема назначувања.

Табела 11 Прецизност на ниво на ампликон за линија на микроби

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), индел	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), индел	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), индел	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Неприменливо	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), индел	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), индел	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Индел	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), индел	0,42	59787	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), индел	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Неприменливо	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индел	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Неприменливо	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), индел	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), индел	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Неприменливо	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	Неприменливо	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), индел	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly 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	Индел	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	77805	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), индел	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Неприменливо	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), индел	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), индел	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Неприменливо	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Неприменливо	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), индел	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Неприменливо	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	Poly C (6), индел	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), индел	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	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Неприменливо	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Неприменливо	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Неприменливо	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Неприменливо	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Неприменливо	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Неприменливо	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), индел	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	Poly C (5), индел	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Неприменливо	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Неприменливо	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), индел	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
88	14	39517884	39517966	83	83	Неприменливо	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), индел	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), индел	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Неприменливо	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Неприменливо	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly 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	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), индел	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	Poly C (5), индел	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), индел (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100

Апликон	Хромозом	Почеток на апликон	Крај на апликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на апликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), индел	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly 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	Неприменливо	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), индел	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Неприменливо	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Неприменливо	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Неприменливо	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Неприменливо	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Неприменливо	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), индел	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	80262	0	0	100

Апликон	Хромозом	Почеток на апликон	Крај на апликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на апликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), индел	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Неприменливо	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Неприменливо	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Неприменливо	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Неприменливо	0,55	0	0	0	Неприменливо
149	Y	2655519	2655609	91	0	Неприменливо	0,48	0	0	0	Неприменливо
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Неприменливо

Резултатите од секвенцирањето за примерокот NA12878 се споредени со генотип со висока доверба за NA12878, утврден од Националниот институт за стандарди и технологија (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (в.2.19). Од 150 ампликони, 92 ампликони целосно се содржеле во геномските региони со висока доверба, 41 ампликони имале делумно преклопување и 17 ампликони не се преклопувале во секвенцата на NIST. Резултатот бил 10.000 координати по реплика за споредба. Неваријантно назначените бази се споредени со референтна секвенца на човечки геном верзија hg19. Резултатите за прецизност се прикажани во [Табела 12](#).

Табела 12 Договор за линија на микроби на примерокот NA12878 со базата на податоци на NIST

Примерок	Бр. на ампликони	Просечна стапка на назначување	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Според податоците обезбедени од студијата за линија на микроби со девет извршувања, инструментот NextSeq 550Dx може да изврши доследно секвенцирање на:

- GC-содржина $\geq 19\%$ (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони со 19% GC-содржина назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,6%)
- GC-содржина $\leq 87\%$ (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони со 87% GC-содржина назначени точно со нулта стапка на отсуство на назначување)
- Должини на PolyA ≤ 9 (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyA со девет нуклеотиди назначени точно со нулта стапка на отсуство на назначување)
- Должини на PolyT ≤ 10 (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyT со десет нуклеотиди назначени точно со нулта стапка на отсуство на назначување)
- Должини на PolyG ≤ 7 (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyG со седум нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 1,0%)
- Должини на PolyC ≤ 6 (сите назначени бази во 2457 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyC со шест нуклеотиди беа назначени точно со нулта стапка на отсуство на назначување)
- Должини на повторување на динуклеотид $\leq 11x$ (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат 11x повторување на динуклеотид беа назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,5%)
- Должини на повторување на тринуклеотид $\leq 5x$ (сите назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат 5x повторување на тринуклеотид беа назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,5%)

- Должини на вметнување ≤ 24 (66343 од 66370 назначени бази во 819 секвенцирани ампликони што содржат вметнување со 24 нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 1,2 %; не дошло до неточни назначувања во регионот што содржи вметнување со 24 нуклеотиди)
- Должини на бришење ≤ 25 (сите назначени бази во 2457 секвенцирани ампликони што содржат бришење со 25 нуклеотиди назначени точно со нулта стапка на отсуство на назначување)

Соматски

Студијата опишана овде е искористена за проценување на прецизноста на назначувањето варијанти на Somatic Variant Module на инструментот NextSeq 550Dx со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Студијава користела репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази (150 ампликони) во 23 различни хромозоми. ДНК на Platinum Genome е извлечена од блокови третирано со FFPE, за да се генерираат шест уникатни примероци за проценка во студијата.

ДНК од примерокот GM12877 била разредена со ДНК од примерокот GM12878 за да се создадат GM12877-D5 и GM12877-D7, како комплет уникатни хетерозиготни варијанти со варијантни фреквенции близу до 5 % и 7 %. ДНК од примерокот GM12878 на сличен начин била разредена со ДНК од примерокот GM12877 за да се создадат GM12878-D5 и GM12878-D7. Секој од примероците бил тестиран во три примероци, освен разредените примероци, коишто биле тестирани во шест примероци. Извршени се вкупно девет извршувања со три инструменти за секвенцирање, три серии на реагенси и три оператори во текот на пет почетни дена. Прецизноста е утврдена за SNV, вметнувања и бришења, со споредување на резултатите со јасно карактеризиран композитен референтен метод, верзија на Platinum Genomes 2016- 1.0. Доверливите геномски региони се утврдени според овој референтен метод, освен ако е поинаку наведено.

Табела 13 Резиме на соматскиот договор

Критериуми	Вкупно забележани резултати ¹	Резултат по забележан резултат ²	Резултат по извршување ³
PPA за SNV	378	98,9	99,9
PPA за вметнувања	378	96,9	99,9
PPA за бришења	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Пресметано како број на примероци по извршување (42) x број на извршувања (9) = 378.

²Најниска забележана вредност по реплика на примерок во сите 9 извршувања.

³Најниска вредност кога податоците од секое извршување се анализирани во агрегат.

Табела 14 ги содржи податоците за студијата презентирани со договор за позитивен и негативен процент по примерок, при што резултатите од варијантите се споредени со јасно карактеризиран композитен референтен метод за пресметки на PPA. Трите типови варијанти (SNV, вметнувања и бришења) се комбинирани. Референтниот метод нуди резултати само за варијантите со еден нуклеотид и вметнувањата/бришењата, па резултатите со неваријантни бази се споредуваат со референтна секвенца за човечки геном верзија hg19 за пресметки на NPA.

Табела 14 Соматски договор по примерок

Примерок	Просечна стапка на назначување	Очекувано	Варијанта без назначувања							
			TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA	
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

Табела 15 ги содржи податоците за студијата презентирани по примерок, при што резултатите од варијантите се споредени со јасно карактеризиран композитен референтен метод. Откривањето е проценето за секој тип варијанта – SNV, вметнувања и бришења – засебно. Референтните положби се исклучени.

Табела 15 Соматски договор по примерок според тип варијанта

Примерок	SNV			Вметнувања			Бришења		
	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN	Очекувано	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

Примерок	SNV			Вметнувања			Бришења		
	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN	Очекувано	TP	FN
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

Десетте примероци понатаму се анализирале за назначување мали вметнувања и бришења (индели) (Табела 16). Имало вкупно 71 индел во опсег на големина од 1 – 24 bp за вметнувања и 1 – 25 bp за бришења.

Табела 16 Резиме на откривањето соматски индели

Тип варијанта	Очекувани варијанти	TP	FN	Варијанта без назначувања	PPA
Вметнување	10773	10282	9	482	99,2
Бришење	11502	10667	5	830	>99,9

150-те ампликони се создадени да опфатат различни геномски содржини. GC-содржината на ампликоните била во опсег од 0,19 – 0,87 %. Ампликоните имале и опсег на повторувања од еден нуклеотид (на пр., PolyA, PolyT), динуклеотид и тринуклеотид. Податоците биле компилирани за по еден ампликон (Табела 17) за да се утврди ефектот на геномската содржина врз процентот на точни назначувања. Процентот на точни назначувања се состои од назначените варијанти и референци и е помал од 100 % ако има неточни назначувања или ако нема назначувања.

Табела 17 Соматска прецизност на ниво на ампликон

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), индел	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), индел	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), индел	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Неприменливо	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), индел	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), индел	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Неприменливо	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), индел	0,42	27459	0	136	99,5

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), индел	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Неприменливо	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индел	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Индел	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Неприменливо	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), индел	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), индел	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Неприменливо	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	Неприменливо	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), индел	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly 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	Индел	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Индел	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Индел	0,53	35681	0	238	99,3

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), индел	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Неприменливо	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), индел	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), индел	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Неприменливо	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Неприменливо	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), индел	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Индел	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Неприменливо	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	Poly C (6), индел	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), индел	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	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Неприменливо	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Неприменливо	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Неприменливо	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Неприменливо	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Неприменливо	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Неприменливо	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), индел	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	Poly C (5), индел	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Неприменливо	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Неприменливо	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), индел	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
88	14	39517884	39517966	83	83	Неприменливо	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), индел	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Индел	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Индел	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), индел	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Индел	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Неприменливо	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Неприменливо	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), индел	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	Poly C (5), индел	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), индел (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9

Ампликон	Хромозом	Почеток на ампликон	Крај на ампликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на ампликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), индел	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly 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	Неприменливо	0,37	34386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), индел	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), индел	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), индел	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Неприменливо	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Неприменливо	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Неприменливо	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Неприменливо	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Неприменливо	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), индел	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Индел	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	36902	0	160	99,6

Апликон	Хромозом	Почеток на апликон	Крај на апликон	Големина на анализираниот фрагмент	Бази во доверливите региони	Геномска содржина на апликон	GC-содржина	Точни назначувања	Неточни назначувања	Без назначувања	% на точни назначувања
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), индел	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Неприменливо	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Неприменливо	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Неприменливо	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Неприменливо	0,55	0	0	0	Неприменливо
149	Y	2655519	2655609	91	0	Неприменливо	0,48	0	0	0	Неприменливо
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Неприменливо

Резултатите од секвенцирањето за примерокот GM12878 се споредени со генотип со висока доверба за NA12878, утврден од Националниот институт за стандарди и технологија (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (в.2.19). Од 150 ампликони, 92 ампликони целосно се содржеле во геномските региони со висока доверба, 41 ампликони имале делумно преклопување и 17 ампликони не се преклопувале во секвенцата на NIST. Резултатот бил 10.000 координати по реплика за споредба. Неваријантно назначените бази се споредени со референтна секвенца на човечки геном верзија hg19. Резултатите за прецизност се прикажани во [Табела 18](#).

Табела 18 Соматски договор на примерокот GM12878 со базата на податоци на NIST

Примерок	Бр. на ампликони	Просечна стапка на назначување	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Според податоците обезбедени од соматската студија со девет извршувања, инструментот NextSeq 550Dx може да изврши доследно секвенцирање на:

- GC-содржина $\geq 19\%$ (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони со 19% GC-содржина назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 2,6%)
- GC-содржина $\leq 87\%$ (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони со 87% GC-содржина назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,6%)
- Должини на PolyA ≤ 9 (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyA со девет нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 2,5%)
- Должини на PolyT ≤ 10 (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyT со десет нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување помала од 0,1%)
- Должини на PolyG ≤ 6 (сите назначени бази во 2268 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyG со шест нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,5%)
- Должини на PolyC ≤ 6 (сите назначени бази во 756 секвенцирани ампликони што содржат повторување на PolyC со шест нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,4%)
- Должини на повторување на динуклеотид $\leq 4x$ (сите назначени бази во 1890 секвенцирани ампликони што содржат 4x повторување на динуклеотид беа назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,9%)
- Должини на повторување на тринуклеотид $\leq 5x$ (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони што содржат 5x повторување на тринуклеотид беа назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 1,4%)

- Должини на вметнување ≤ 23 (сите назначени бази во 378 секвенцирани ампликони што содржат вметнување со 23 нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,8 %)
- Должини на бришење ≤ 25 (сите назначени бази во 1134 секвенцирани ампликони што содржат бришење со 25 нуклеотиди назначени точно со стапка на отсуство на назначување од 0,7%)

Прецизност

Прецизноста на инструментот NextSeq 550Dx е утврдена со тестирање 13 уникатни примероци на Platinum Genome со три инструменти, три серии на реагенси и три оператори, за да се генерираат девет извршувања за секвенцирање во текот на пет почетни дена. Репрезентативната анализа, примероците и референтниот метод се истите што се опишани за студијата за прецизност на линијата на микроби. Придонесите за прецизност се утврдени со анализата на компонентите за варијација со VAF како променлива на одговор и со пресметување на стандардните отстапки на ниво на компонентите на инструментот, серијата на реагенси, операторот и почетниот ден (Табела 19). Вкупниот број на забележани резултати што се користат во анализата за секоја компонента на инструментот, операторот или варијабилност во серијата на реагенси е 699, 176 и 235 за SNV, вметнувањата и бришењата, по тој редослед.

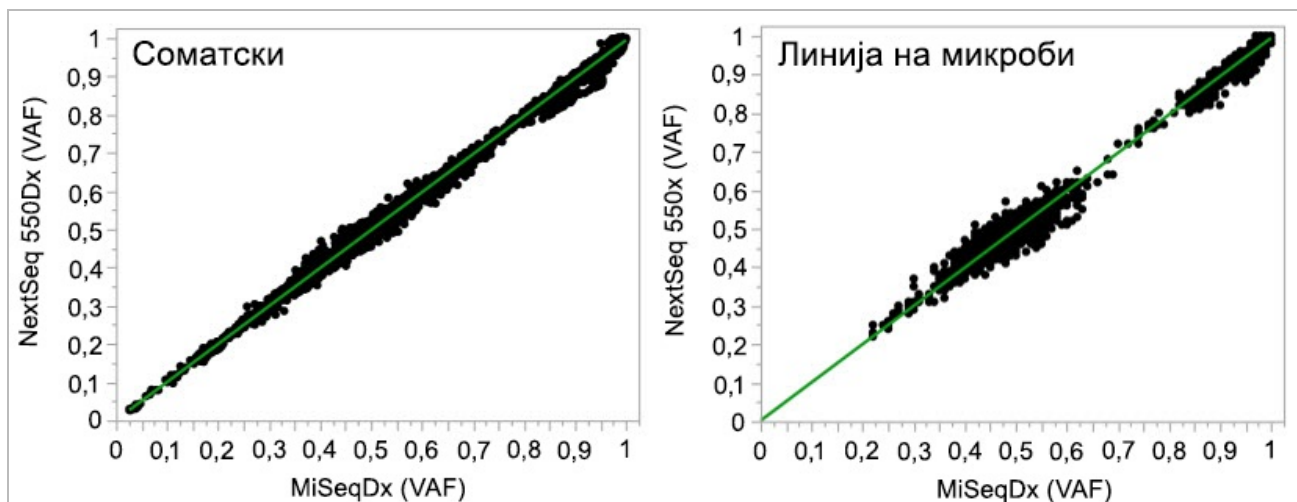
Табела 19 Резултати за прецизност за инструментот NextSeq 550Dx (стандардна отстапка)

Компонента	Тип варијанта	SD на компонента		Вкупно SD	
		Максимум	Средна вредност	Максимум	Средна вредност
Серија	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Вметнување	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Бришење	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Инструмент	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Вметнување	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Бришење	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Оператор	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Вметнување	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Бришење	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Ден	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Вметнување	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Бришење	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Споредба на методи (платформа за секвенцирање)

Примероците од цела крв и FFPE се испитани на инструментот NextSeq 550Dx и инструментот MiSeqDx со работните текови за линија на микроби и соматска обработка на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Договорот за фреквенција на варијанти за примероците од крв и FFPE се проценети со повеќе репрезентативни анализи. [Слика 2](#) го прикажува соодносот на VAF помеѓу двата инструменти за една репрезентативна анализа, а [Табела 20](#) го резимира ваквиот сооднос преку панел за анализа. Според силниот сооднос помеѓу инструментот MiSeqDx и инструментот NextSeq 550Dx, утврдено е дека карактеристиките на изведбата поврзани со преданалитичките фактори (на пр., методите на извлекување или супстанцииите кои го попречуваат процесот) важат за двата инструменти. Разгледајте го летокот на пакетот за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx за дополнителни детали.

Слика 2 Сооднос на VAF на инструментите MiSeqDx и NextSeq 550Dx за примероци од FFPE (лево) и крв (десно) со анализата 1



Табела 20 Резултати од споредбата на методи со уникатни примероци од крв и FFPE

Извор на гДНК (геномска ДНК)	Анализа (олиго-панел)	Биолошки реплики (примероци)	Технички реплики (по примерок)	Забележани резултати (бр. на варијанти)	Пад	Пресрет-нување	Сооднос (R ²)
Крв	Анализа 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Крв	Анализа 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Анализа 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Анализа 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Две податочни точки се отстранети, според наведеното ограничување за Germline Variant Module.

²Коефициентот на утврдување за VAF се одвива како што е илустрирано на Слика 2.

Репродуктивност

Репродуктивноста на инструментот NextSeq 550Dx се проценила со примероци на Platinum Genome со репрезентативна анализа создадена за испитување различни гени што опфаќаат 12.588 бази во 23 различни хромозоми со 150 ампликони. Тестирањето на линијата на микроби се состои од седум реплики од по 13 примероци; соматското тестирање се состои од шест реплики од по седум примероци на различни нивоа на VAF. Примероците биле подготвени со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Тестирањето се извршило на три надворешни локации со една серија на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). На сите локации се користел еден инструмент NextSeq 550Dx. Двајца оператори го спровеле тестирањето на секоја локација. Секој оператор го извршил тестирањето во три непоследователни почетни дена за секој тип примерок, со вкупно 36 извршувања на трите локации. Тестирањето резултирало со по 18 извршувања за работниот тек за линијата на микроби и за соматскиот работен тек.

Линија на микроби

Варијантите за линија на микроби со ниво на VAF $\geq 0,2$ се пријавени како позитивни (варијанта). За очекуваните позитивни варијанти за линија на микроби, податоците за процените за стапка на отсуство на назначување и стапка на точно позитивно назначување за секој тип варијанта (SNV, вметнување, бришење). Табела 21 ги резимира откриените стапки, заедно со долните и горните нивоа на доверба (LCL/UCL lower confidence levels/upper confidence levels) од 95 %, пресметани со методот за бодување на Wilson, за секој тип варијанта.

Табела 21 Забележани резултати за назначување линија на микроби за очекуваните позитивни резултати според тип варијанта

Тип варијанта	Отсуство на назначување			Точно позитивно назначување				
	Резултат	Вкупно	Процент	Резултат	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Вметнувања	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Бришења	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Варијантите за линија на микроби со ниво на VAF $< 0,2$ се пријавени како негативни (непредвидливи). За очекуваните негативни локации за линија на микроби, податоците се проценети за стапка на отсуство на назначување и стапка на точно непредвидливо назначување. Табела 22 ги резимира откриените стапки, заедно со долните и горните нивоа на доверба (LCL/UCL lower confidence levels/upper confidence levels) од 95 %, пресметани со методот за бодување на Wilson.

Табела 22 Забележани резултати за назначување линија на микроби за очекуваните негативни резултати

Тип варијанта	Отсуство на назначување			Точно негативно назначување				
	Резултат	Вкупно	Процент	Резултат	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Непред - видливи	4883	19.600.182	0,025	19595299	19595299	100	100,00	100,00

Варијантите за линија на микроби со ниво на VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ се нарекуваат позитивни хетерозиготни за варијантата, а варијантите со ниво на VAF $\geq 0,7$ се нарекуваат позитивни хомозиготни за варијантата. Се користеле примероци од линија на микроби со хетерозиготни варијанти за да се утврди дали инхерентната варијабилност на анализата би влијаела врз назначувањето генотип. Сх се утврдило за двете граници (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипи), при што x е пропорцијата на повторени тестови што ги надминале границите. За долната граница од 0,2 VAF, Сх било $\geq 99,999\%$, што укажува дека $\geq 99,999\%$ од хетерозиготните варијанти се назначуваат како хетерозиготни. Во однос на горната граница од 0,7 VAF, Сх било $\leq 0,001\%$, што укажува дека $\leq 0,001\%$ од хетерозиготните варијанти се назначуваат како хомозиготни. Табела 23 ги резимира резултатите според типот варијанта.

Варијантите за линија на микроби со ниво на VAF $\geq 0,2$ и $< 0,7$ се нарекуваат позитивни хетерозиготни за варијантата, а варијантите со ниво на VAF $\geq 0,7$ се нарекуваат позитивни хомозиготни за варијантата. Се користеле примероци од линија на микроби со хетерозиготни варијанти за да се утврди дали инхерентната варијабилност на анализата би влијаела врз назначувањето генотип. Сх се утврдило за двете граници (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипи), при што x е пропорцијата на повторени тестови што ја надминале границата. Во однос на долната граница од 0,2 VAF, Сх било $\geq 99,999\%$, што укажува дека $\geq 99,999\%$ од хетерозиготните варијанти се назначуваат како хетерозиготни. За горната граница од 0,7 VAF, Сх било $\leq 0,001\%$, што укажува дека $\leq 0,001\%$ од хетерозиготните варијанти се назначуваат како хомозиготни. Табела 23 ги резимира резултатите според типот варијанта.

Табела 23 Вредности на Сх за линија на микроби за хетерозиготни варијанти

Тип варијанта	Граница од 0,2 VAF	Граница од 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Вметнувања	24/24	24/24
Бришења	35/35	35/35
Вкупно	153	153

Соматски

Соматските варијанти со нивоа на VAF $\geq 0,026$ се пријавени како позитивни (варијанта). Забележаните резултати со нивоа на VAF $\geq 0,01$ и $< 0,026$ се сметаат за двосмислени за потребите на оваа анализа (ниту позитивни ниту негативни, означени како ниска варијантна фреквенција). За да се процени изведбата, резултатите се пресметани на три начини:

- Најдобар случај: секој двосмислен резултат се смета за точно позитивно назначување (согласно со очекуваните резултати)
- Најлош случај: секој двосмислен резултат се смета за неточно назначување (спротивно на очекуваните резултати)
- Случај на исклучување: секој двосмислен резултат се исклучува од анализата

Три табели, Табела 24, Табела 25 и Табела 26, ги резимираат резултатите од назначувањата за најдобар случај, најлош случај и случај на исклучување, по тој редослед, заедно со долните и горните нивоа на доверба (LCL/UCL lower confidence levels/upper confidence levels) од 95 %, пресметани со методот за бодување на Wilson.

Табела 24 Забележани резултати за соматско назначување за очекуваните позитивни резултати според тип варијанта (најдобар случај)

Тип варијанта	Точно позитивно назначување				
	Резултат	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54346	54346	100	99,99	100,00
Вметнувања	18036	18036	100	99,98	100,00
Бришења	18381	18381	100	99,98	100,00

Табела 25 Забележани резултати за соматско назначување за очекуваните позитивни резултати според тип варијанта (најлош случај)

Тип варијанта	Точно позитивно назначување				
	Резултат	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54346	54346	100	99,99	100,00
Вметнувања	18000	18036	99,8	99,72	99,86
Бришења	18381	18381	100	99,98	100,00

Табела 26 Забележани резултати за соматско назначување за очекуваните позитивни резултати според тип варијанта (отстранување на двосмислените назначувања)

Тип варијанта	Точно позитивно назначување				
	Резултат	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54346	54346	100	99,99	100,00
Вметнувања	18000	18000	100	99,98	100,00
Бришења	18381	18381	100	99,98	100,00

Соматските варијанти со ниво на VAF < 0,01 се пријавени како негативни (непредвидливи) назначувања. За очекуваните негативни соматски локации, податоците се проценети за стапка на отсуство на назначување и стапка на точно непредвидливо назначување. Точните непредвидливи назначувања се утврдени со исклучување на неназначените и одземање на назначувањата со забележани резултати што биле во двосмислената зона (нивоа на VAF $\geq 0,01$ и < 0,026), како и неточните назначувања што биле над границата (нивоа на VAF $\geq 0,026$) од вкупниот резултат. Табела 27 ги резимира забележаните резултати, вкупниот резултат и резултатите во проценти за негативни соматски локации за стапка на отсуство на назначување и стапка на точно непредвидливо назначување, заедно со долните и горните нивоа на доверба (LCL/UCL lower confidence levels/upper confidence levels) од 95 %, пресметани со методот за бодување на Wilson.

Табела 27 Забележани резултати за соматско назначување за очекуваните негативни резултати

Варијанта Тип	Отсуство на назначување			Точно назначување						
	Резултат	Вкупно	Процент	Двосмис- лено	Неточно	Точно	Вкупно	Процент	95 % LCL	95 % UCL
Непредвидливи	36326	8909676	0,408	2254	121	8870975	8873350	99,97	99,972	99,974

Соматските примероци на различни нивоа на VAF за истата варијанта се пресметани за да се утврди C95 на анализата (во рамките на секој тип варијанта). За да се процени варијабилноста во близина на границата на анализата, искористени се примероците со очекувани нивоа на VAF помеѓу 0,02 и 0,07. C95 е утврдено за секоја варијанта, со највисоко C95 за секој тип варијанта пријавено во Табела 28.

Табела 28 Резиме за соматски C95

Тип варијанта	N	C95
SNV	74	0,0613
Вметнување	24	0,0573
Бришење	33	0,0575

Изведба на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycle)

Преглед

NextSeq 550Dx е поддржан од два комплети реагенси: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). За да се демонстрира дека NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) може да ги исполни условите за аналитичка изведба проверени и потврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), спроведени се студии со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Извршени се две подготовки на збирки со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, една со работниот тек Germline (Линија на микроби) и друга со работниот тек Somatic (Соматски). Збирките од секој работен тек се тестирали со три серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) со три инструменти NextSeq 550Dx. Дополнително, тестирањето за секој работен тек вклучувало едно извршување со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Аналитичка чувствителност (граница на празно [LoB, Limit of Blank] и граница на откривање [LoD, Limit of Detection])

Проверката со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) демонстрирала дека инструментот NextSeq 550Dx може да открива варијанти со 0,05 VAF со грешка од тип II $\leq 0,05$ и дека границата од 0,026 VAF користена од Somatic Variant Module (ефективна LoB) поддржува грешка од тип I $\leq 0,01$. Според овие тврдења, се очекува варијантата со 0,05 VAF да биде поголема од или еднаква на 0,026 VAF 95 % од времето и дека непредвидливата положба е помала од 0,026 VAF 99 % од времето. За да бидеме сигурни дека ваквите тврдења се исполнети со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), спроведени се повторни мерења на инструментот NextSeq 550Dx со примероци со непредвидлива положба (примероци за LoB) и со примероци со варијанти од 0,05 VAF (примероци за LoD) со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Пропорцијата на назначувања над и под границата од 0,026 потоа се спореди со тврдењата утврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Во тестирањето биле вклучени два примероци за LoD, секој со уникатен комплет варијанти за 0,05 VAF и соодветни примероци за LoB со непредвидлива положба за варијантите што биле цел. За подготовката на збирки, примероците за LoD и LoB се обработувани во осум и седум реплики, по тој редослед, со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Збирките првично се секвенцирани со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) за да се идентификуваат варијантите/геномските координати за проценка на LoB/LoD со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Сите варијанти со просек за VAF помеѓу 0,045 – 0,055 (варијанти на LoD) засновани на резултатите од NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) се искористени за анализа на LoD (N = 51 варијанти). За анализа на LoB, проценети се соодветните 51 геномска координата.

За проценка на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), збирките се секвенцирани во три извршувања во текот на три последователни дена со истиот инструмент и истата серија на комплетот реагенси. Ваквото тестирање дало 24 реплики за секоја од 51 варијанта на LoD и 21 реплика за секоја од

соодветните непредвидливи положби. Пропорцијата на непредвидливи положби со VAF < 0,026 е наведена во Табела 29. Пропорцијата на варијанти на LoD со VAF поголемо од или еднакво на 0,026 е наведена во Табела 30.

Табела 29 Пропорција на назначувања < 0,026 со непредвидливи положби (проценка на тврдење за LoB)

Варијанта Тип	Проценети положби	Вкупно забележани резултати	Бр. на мерења за VAF $\geq 2,6\%$	Пропорција < 2,6 %	Пропорција од 95 % Интервал на доверба
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Вметнување	11	231	0	1	0,984 – 1
Бришење	8	168	0	1	0,978 – 1

Табела 30 Пропорција на назначувања $\geq 0,026$ VAF за варијанти на LoD (проценка на тврдења за LoD)

Варијанта Тип	Проценети положби	Вкупно забележани резултати	Бр. на мерења за VAF < 2,6 %	Бр. на мерења за VAF $\geq 2,6\%$	Пропорција $\geq 2,6\%$	Пропорција од 95 % Интервал на доверба
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Вметнување	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Бришење	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Прецизност

Линија на микроби

Следнава студија е спроведена за да се процени прецизноста на назначувањето варијанти со Germline Variant Module со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Тестирани се дванаесет уникатни примероци на Platinum Genome со репрезентативна анализа. Спроведени се вкупно 11 извршувања со три инструменти NextSeq 550Dx и три NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Прецизноста е утврдена за SNV, вметнувања и бришења, со споредување на резултатите со јасно карактеризиран композитен референтен метод, верзија на Platinum Genomes 2016-1.0. Резултатите за прецизност од извршување со едно секвенцирање со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) се наведени како референца. Резимето на резултатите е наведено во Табела 31.

Табела 31 Резиме на договорот за линија на микроби

Критериуми	Вкупно забележани резултати (v2.5) ¹	Резултат по забележан резултат (v2.5) ²	Резултат по забележан резултат (v2) ³	Резултат по извршување (v2.5) ⁴	Резултат по извршување (v2) ⁴
PPA за SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA за вметнувања	1056	100	100	100	100
PPA за бришења	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

¹Пресметано како број на примероци по извршување x број на извршувања (96 примероци по извршување x 11 извршувања = 1056 забележани резултати).

²Најниска забележана вредност по реплика на примерок во сите извршувања (врз основа на 11 извршувања за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Најниска забележана вредност по реплика на примерок во 1 извршување (вкупно 96 забележани резултати).

⁴Најниска вредност кога податоците од секое извршување се анализирани во агрегат.

Соматски

Следнава студија е спроведена за да се процени прецизноста на назначувањето варијанти на Somatic Variant Module на инструментот NextSeq 550Dx со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Тестирани се десет FFPE-примероци на Platinum Genome (два со варијанти разредени до 0,05 VAF) со репрезентативна анализа. Спроведени се вкупно 11 извршувања со три инструменти NextSeq 550Dx и три серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Прецизноста е утврдена за SNV, вметнувања и бришења, со споредување на резултатите со јасно карактеризиран композитен референтен метод, верзија на Platinum Genomes 2016-1.0. Резултатите за прецизност од извршување со едно секвенцирање со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) се наведени како референца. Резимето на резултатите е наведено во [Табела 32](#).

Табела 32 Резиме на соматскиот договор

Критериуми	Вкупно забележани резултати (v2.5) ¹	Резултат по забележан резултат (v2.5) ²	Резултат по забележан резултат (v2) ³	Резултат по извршување (v2.5) ⁴	Резултат по извршување (v2) ⁴
PPA за SNV	528	100	100	100	100
PPA за вметнувања	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA за бришења	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

¹Пресметано како број на примероци по извршување x број на извршувања (48 примероци по извршување x 11 извршувања = 528 забележани резултати).

²Најниска забележана вредност по реплика на примерок во сите извршувања (врз основа на 11 извршувања за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Најниска забележана вредност по реплика на примерок во 1 извршување (вкупно 96 забележани резултати).

⁴Најниска вредност кога податоците од секое извршување се анализирани во агрегат.

Прецизност

Линија на микроби

Прецизноста на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) со Germline Variant Module е проценета со примероци на Platinum Genome и репрезентативна анализа. Тестирањето се состоело од една подготовка на збирка со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и вклучило 12 примероци обработени со по осум реплики за секој од нив. Збирките се секвенцирале со три серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) и три инструменти NextSeq 550Dx за вкупно девет извршувања за секвенцирање.

Се користеле примероци со хетерозиготни варијанти за да се утврди дали инхерентната варијабилност на анализата би влијаела врз назначувањето генотип (N = 153 уникатни хетерозиготни варијанти). Сх се утврдило и за границите на Germline Variant Module (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипи), при што х е пропорцијата на повторени тестови што ги надминале границите. За пониската граница од 0,2 VAF, варијантата со минимално Сх за NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) била > 99,9 %, што укажува дека > 99,9 % од хетерозиготните варијанти би се назначиле како хетерозиготни. За повисоката граница од 0,7 VAF, варијантата со максимално Сх за NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) била < 1,5 %, што укажува дека ≤ 1,5 % од хетерозиготните варијанти би се назначиле како хомозиготни.

Табела 33 ги резимира резултатите според типот варијанта. Вредностите на Сх од извршувањето со едно секвенцирање со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) се наведени како референца.

Табела 33 Вредности на Cx за линија на микроби за хетерозиготни варијанти

Тип варијанта	N	Граница од 0,2 VAF		Граница од 0,7 VAF	
		Мин. Cx (v2.5) ¹	Мин. Cx (v2) ²	Макс. Cx (v2.5) ¹	Макс. Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Вметнувања	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Бришења	35	100 %	>99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

¹Вредности на Cx според процените за вкупно стандардно отстапување од анализата на компонентите за варијација.

²Вредности на Cx според стандардните отстапувања на примерокот.

Соматски

Прецизноста на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) со Somatic Variant Module е проценета со платинести FFPE-примероци на Platinum Genome и репрезентативна анализа. Тестирањето се состоело од една подготовка на збирка со TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и вклучило два примероци со по осум реплики за секој од нив. Збирките се секвенцирале со три серии на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) и три инструменти NextSeq 550Dx, за вкупно девет извршувања за секвенцирање.

Соматските варијанти со очекувани нивоа на VAF $\leq 0,10$ VAF (N = 131 уникатна варијанта) се искористени за проценка на варијабилноста на инструментот во близина на границата за VAF на Somatic Variant Module (соматските варијанти со ниво на VAF $\geq 0,026$ се нарекуваат позитивни за варијантата). Вредностите за C95 се утврдени за секоја од соматските варијанти. Вредностите за C95 го претставуваат VAF при којшто веројатноста да биде повисоко од границата на VAF на Somatic Variant Module е 95 %. Највисоките вредности за C95 по тип варијанта се наведени во [Табела 34](#). Резултатите за C95 од извршување со едно секвенцирање со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) се наведени како референца.

Табела 34 Резиме за соматски C95

Тип варијанта	Бр. на проценети варијанти	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Вметнувања	24	0,062	0,061
Бришења	33	0,060	0,060

¹Вредности за C95 според процените за вкупно стандардно отстапување од анализата на компонентите за варијација.

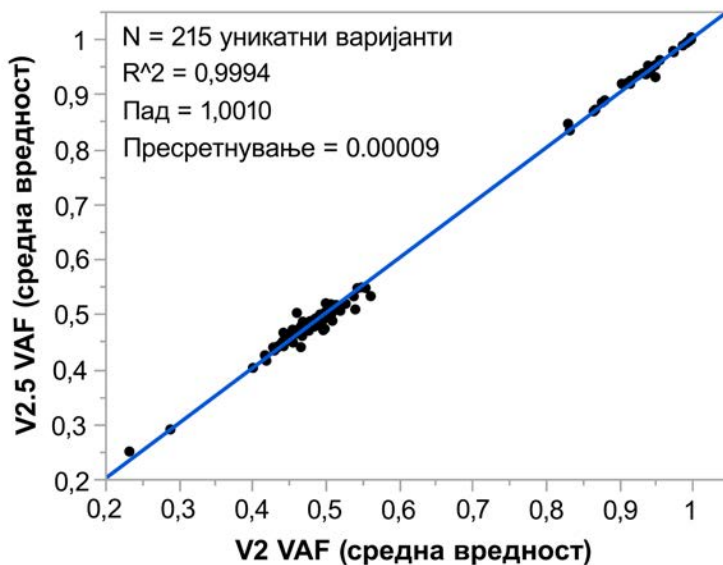
²Вредности за C95 според стандардните отстапувања на примерокот.

Споредба на методи (комплет реагенси)

Линија на микроби

Просечните VAF од 215 уникатни варијанти се проценети на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) со резултатите генерирани од Germline Variant Module. Просечните вредности за VAF се пресметани од 11 извршувања за секвенцирање (v2.5) и едно извршување за секвенцирање (v2). Искористени се најмалку осум реплики за се пресмета просекот за секоја варијанта. Слика 3 го прикажува соодносот на VAF помеѓу двата комплети реагенси. Врз основа на силниот линеарен сооднос на VAF и сличноста во резултатите помеѓу комплетите реагенси, карактеристиките на изведбата првично проценети и потврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) со Germline Variant Module важат и за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

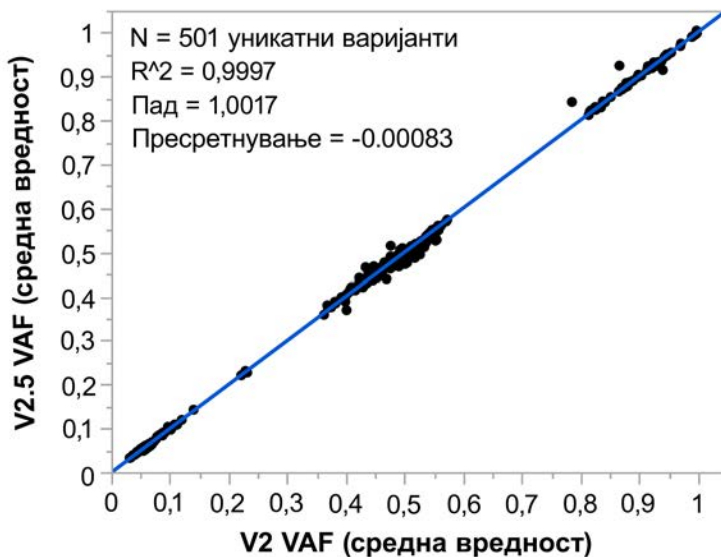
Слика 3 Сооднос на варијантна фреквенција на алели (VAF, Variant Allele Frequency) за Germline Variant Module помеѓу NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Соматски

Просечните VAF за 501 уникатни варијанти се проценети на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) со резултатите генерирани од Somatic Variant Module. Просечните вредности за VAF се пресметани од 11 извршувања за секвенцирање (v2.5) и едно извршување за секвенцирање (v2). Искористени се најмалку три реплики за се пресмета просекот за секоја уникатна варијанта. Слика 4 го прикажува соодносот на VAF помеѓу двата комплети реагенси. Врз основа на соодносот на VAF и сличноста во резултатите помеѓу комплетите реагенси, карактеристиките на изведбата проценети и потврдени со NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) со Somatic Variant Module важат и за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Слика 4 Сооднос на варијантна фреквенција на алели (VAF, Variant Allele Frequency) за Somatic Variant Module помеѓу NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Историја на ревизии

Документ	Датум	Опис на промената
Бр. на документ 1000000030326 v07	Август 2023 г.	<p>Додадовме содржини за поддршка на изборниот Illumina DRAGEN сервер за NextSeq 550Dx.</p> <p>Го ажуриравме бројот на дел за филтерот за воздух.</p> <p>Го ажуриравме бројот на варијанти на FFPE (соматски) што се користат за утврдување на варијантните фреквенции на алелите.</p> <p>Ја ажуриравме табелата Резиме на договорот за линија на микроби.</p> <p>Додадовме предупредување за закани за компјутерската безбедност.</p>
Бр. на документ 1000000030326 v06	Мај 2022 г.	Извршивме ажурирања за поправка на содржините што ненамерно се додаваат од изворниот софтвер.
Бр. на документ 1000000030326 v05	Ноември 2021 г.	<p>Додадовме изјава за предупредувања и мерки на претпазливост за пријавувањето сериозни инциденти.</p> <p>Додадовме изјава во принципите на процедурата што го наведува предвидениот корисник.</p> <p>Ја отстранивме референцата на High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Додадовме референца на High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).</p>
Бр. на документ 1000000030326 v04	Август 2021 г.	Додадовме табела за Историја на ревизии. Ја ажуриравме адресата на овластениот застапник за ЕУ.

Патенти и заштитни знаци

Овој документ и неговата содржина се сопственост на Illumina, Inc. и нејзините подружници („Illumina“) и се наменети само за договорно користење од страна на клиенти, заедно со користењето на производот/производите опишан/и овде и за никаква друга цел. Овој документ и неговата содржина не смее да се користат или да се дистрибуираат за која било друга цел и/или на друг начин да се пренесуваат, откриваат или репродуцираат на каков било начин без претходна писмена согласност на Illumina. Illumina не пренесува никаква лиценца со својот патент, трговска марка, авторски права или обични права, ниту слични права на ниту една трета страна со овој документ.

Квалификуваниот и соодветно обучен персонал мора строго и експлицитно да го следи упатството од овој документ за да се овозможи соодветно и безбедно користење на производот/производите опишан/и овде. Целата содржина на овој документ мора целосно да се прочита и да се разбере пред да се користи/користат производот/производите.

ДОКОЛКУ НЕ СЕ ПРОЧИТА И НЕ СЕ СЛЕДИ ЕКСПЛИЦИТНО ЦЕЛОТО УПАТСТВО ШТО Е НАВЕДЕНО ОВДЕ, МОЖЕ ДА ДОЈДЕ ДО ОШТЕТУВАЊЕ НА ПРОИЗВОДОТ/ПРОИЗВОДИТЕ, ПОВРЕДА НА ЛИЦА, ВКЛУЧУВАЈЌИ ГИ КОРИСНИЦИТЕ ИЛИ ДРУГИТЕ, И ОШТЕТУВАЊЕ НА ДРУГ ИМОТ, А СО ТОА И ЌЕ СЕ ПОНИШТИ ГАРАНЦИЈАТА ШТО ВАЖИ ЗА ПРОИЗВОДОТ/ПРОИЗВОДИТЕ.

ILLUMINA НЕ ПРЕЗЕМА НИКАКВА ОДГОВОРНОСТ КАКО РЕЗУЛТАТ НА НЕСООДВЕТНО КОРИСТЕЊЕ НА ПРОИЗВОДОТ/ПРОИЗВОДИТЕ ОПИШАН/И ОВДЕ (ВКЛУЧУВАЈЌИ ГИ НИВНИТЕ ДЕЛОВИ ИЛИ СОФТВЕРОТ).

© 2023 Illumina, Inc. Сите права се задржани.

Сите заштитни знаци се сопственост на Illumina, Inc. или соодветните сопственици. За информации за конкретни заштитни знаци, разгледајте www.illumina.com/company/legal.html.

Податоци за контакт



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 САД
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (надвор од Северна Америка)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Ознаки на производот

За целосен список со симболите што ги има на пакувањето и етикетата на уредот, погледнете ја легендата за симболи на support.illumina.com на картичката *Documentation* (Документација) за вашиот комплет.