

# Přístroj NextSeq™ 550Dx

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO

URČENO POUZE NA EXPORT

Katalogové č. 20005715

## Účel použití

Přístroj NextSeq 550Dx je určen k sekvenování DNA knihoven s využitím *in vitro* diagnostických rozborů. Přístroj NextSeq 550Dx je třeba používat s určitými registrovanými, certifikovanými nebo schválenými *in vitro* diagnostickými reagensy a analytickým softwarem.

## Principy postupu

Přístroj Illumina NextSeq 550Dx je určen k sekvenování DNA knihoven s využitím diagnostických rozborů *in vitro* a je určen k použití kvalifikovaným a vyškoleným klinickým laboratorním personálem, který je vyškolen v používání diagnostických postupů *in vitro* prováděných v klinické laboratoři. Jako vstup tato sada reagensů NextSeq 550Dx používá knihovny vytvořené z DNA, kdy se indexy vzorků a zachycené sekvence připojují k cílům. Knihovny vzorků se zachytí v průtokové kyvetě a jsou přístrojem sekvenovány pomocí chemikálií pro technologii SBS (sequencing by synthesis). Technologie SBS využívá metodu reverzibilního terminátoru k detekci fluorescenčně značených jednotlivých nukleotidových bází tak, jak se začleňují do rostoucích řetězců DNA. Software pro analýzu v reálném čase (RTA) provádí analýzu snímků a volání bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přiřadí kvalitativní skóre. Když je primární analýza dokončena, lze přístrojem provést sekundární analýzu, která zpracuje volání bází. V závislosti na pracovním postupu využívá NextSeq 550Dx pro sekundární analýzu různé moduly. U modulů pro analýzu germinálních nebo somatických variant zahrnuje zpracování demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, volání variant a generování souborů ve formátu volání variant (VCF a gVCF). Soubory VCF a gVCF obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu.

## Konfigurace s duálním bootováním

Přístroj NextSeq 550Dx zahrnuje konfiguraci s duálním bootováním, která umožňuje použití přístroje buď v diagnostickém režimu (Dx), nebo pouze pro účely výzkumu (RUO). *In vitro* diagnostické sekvenční analýzy, zahrnující moduly pro analýzu germinálních a somatických variant, se provádějí v diagnostickém režimu. V diagnostickém režimu lze použít pouze reagensie pro sekvenování IVD. Výkonnostní charakteristiky a limity procedury přístroje NextSeq 550Dx se stanovily v diagnostickém režimu za použití modulů pro analýzu germinálních a somatických variant.

## Omezení postupu

- 1 Určeno k diagnostice *in vitro*.
- 2 Když se moduly pro analýzu germinálních a somatických variant používají se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) nebo se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů), dokážou zajistit:
  - ▶ Výkon sekvenování  $\geq 90$  gigabází (Gb)
  - ▶ Délku čtení (v běhu paired-end)  $2 \times 150$  párů bází (bp)
  - ▶ Při délce čtení  $2 \times 150$  bp se báze se rovnají nebo jsou větší než  $Q30 \geq 75\%$   
Báze rovné nebo větší než  $75\%$  mají kvalitativní skóre Phred  $\geq 30$ , což znamená, že přesnost volání bází je větší než  $99,9\%$

- 3 Čtení s indely (inzercemi, delecemi nebo jejich kombinacemi), kde je délka obsahu > 25 bp rozborový software neseřadí. Proto indely o délce > 25 bp nejsou pro Assay Software zjištělné.
- 4 Rozborový software nemusí seřadit čtení ampliconů s extrémním obsahem variant, což může vyústit v to, že oblast bude vykázána jako divoký typ. Takový extrémní obsah zahrnuje:
  - ▶ Čtení obsahující více než tři indely
  - ▶ Čtení o délce alespoň 30 bp s obsahem jednonukleotidové varianty (SNV) > 4 % celkové cílové délky ampliconu (vyjma sondovacích míst)
  - ▶ Čtení o délce <30 bp s obsahem SNV >10 % celkové délky ampliconu (včetně oblastí sondy)
- 5 Velké varianty, včetně vícenásobných nukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jsou samostatné malé varianty.
- 6 Varianty delecí mohou být při přemostění dvou překrývajících ampliconů filtrovány nebo opomenuty, je-li délka delece větší než překryv mezi překrývajícími amplicony, nebo se mu rovná.
- 7 Systém nedokáže detekovat indely, pokud sousedí přímo s primerem a není zde žádný překrývající amplicon. U oblastí s překrývajícími amplicony rozbor nedokáže detekovat delece, pokud je oblast překrytí menší než velikost delece, která se má detekovat. Pokud například oblast překrytí dvou sousedících ampliconů zahrnuje dvě báze, rozbor nedokáže detekovat žádné delece včetně těchto dvou bází. Delece jedné báze na kterékoliv z těchto bází zjištěna být může.
- 8 Jako v případě jakéhokoliv pracovního postupu pro přípravu knihovny na základě hybridizace mohou základní polymorfismy, mutace, inserce nebo delece v oblastech vázání oligonukleotidů ovlivnit sondované alely a volání činěná během sekvenování. Příklad:
  - ▶ Varianta ve fázi s variantou v oblasti primeru se nemusí amplifikovat, což vyústit ve falešnou negativitu.
  - ▶ Varianty v oblasti primeru by mohly zabránit amplifikaci referenční alely, což by vedlo k nesprávnému signálu homozygotní varianty.
  - ▶ Varianty indelů v oblasti primeru mohou způsobit falešné pozitivní volání na konci čtení přilehlého k primeru.
- 9 Pokud se indely vyskytnou poblíž konce jednoho čtení a během seřazení se jemně připnou, lze je kvůli vychýlení vláken filtrovat.
- 10 Malé MNV se nepotvrdí a jsou vykázány pouze v modulu pro analýzu somatických variant.
- 11 Delece se vykážou ve VCF na souřadnici předcházející báze v souladu s formátem VCF. Proto před vykázáním, že volání jednotlivé báze je homozygotní referencí, vezměte v úvahu sousedící varianty.
- 12 Omezení specifická pro germinální postup:
  - ▶ Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Germline Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je určen k poskytování kvalitativních výsledků volání germinálních variant (např. homozygotních, heterozygotních, divokého typu).
  - ▶ Při použití s modulem pro analýzu germinálních variant je pro přesné volání variant potřeba minimální pokrytí na amplicon 150x. V důsledku toho je potřeba 150 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 300 překrývajícím se čtením párových konců. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
  - ▶ Zda bude varianta identifikována jako homozygotní nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
  - ▶ Varianty v určitém opakujícím se kontextu se vyfiltrují do souborů VCF. Filtr opakování RMxN se používá k filtrování variant, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá nebo část sekvence varianty. U volání germinálních variant je k filtrování varianty potřeba alespoň devět opakování v referenci. V úvahu se berou pouze opakování o délce do 5 bp (R5x9).
  - ▶ Indel a SNV na jednom lokusu mohou vyústit ve vykázání pouze jedné varianty.
- 13 Omezení specifická pro somatický postup:
  - ▶ Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Somatic Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky signálu somatických variant (např. přítomnost somatické varianty s četnostní varianty větší nebo rovnající se 0,026 s limitem detekce 0,05).

- ▶ Při použití s modulem pro analýzu somatických variant je pro přesné volání variant potřeba minimální pokrytí na amplikon 450× na oligonukleotidový fond. Na jeden fond oligonukleotidů je tedy zapotřebí 450 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 900 překrývajícím se čtením párových konců. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
- ▶ U volání somatických variant je pro filtrování varianty potřeba alespoň šest opakování v referenci, přičemž se berou v úvahu pouze opakování o délce max. 3 bp (R3x6).
- ▶ Modul pro analýzu somatických variant nedokáže rozlišit mezi germinálními a somatickými variantami. Modul je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
- ▶ Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založená na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádoru a z normální tkáně.

## Součásti produktu

- 1 Přístroj NextSeq 550Dx (katalogové č. 20005715)
- 2 Softwarové komponenty přístroje NextSeq 550Dx, a to včetně následujících:

Softwarová aplikace	Funkce	Popis
Obslužný software NextSeq 550Dx (NOS)	Ovládá provoz přístroje	Softwarová aplikace NOS řídí provoz přístroje během sekvenování a vytváří snímky pro použití softwarem pro analýzu v reálném čase (RTA).
Software pro analýzu v reálném čase (RTA)	Provádí primární analýzu	Softwarová aplikace RTA konvertuje snímky generované NOS pro každou dlaždici na cyklus běhu sekvenování do souborů volání bází, které jsou vstupy pro analytické moduly Local Run Manager. Softwarová aplikace RTA neobsahuje uživatelské rozhraní.
Local Run Manager	Rozhraní pro výběr modulu	Software Local Run Manager je řešení pro správu uživatelů, výběr vhodného analytického modulu a stav monitorování, které je integrované přímo do přístroje.
Modul pro analýzu somatických variant	Provádí sekundární analýzu	Tento analytický modul softwaru Local Run Manager zpracovává volání bází prostřednictvím sekundární analýzy. Zpracování zahrnuje demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, volání variant a vykazování. Program pro detekci variant (Pisces) generuje soubory VCF, které obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu, a zahrnuje naměřenou frekvenci variant.
Modul pro analýzu germinálních variant	Provádí sekundární analýzu	Tento analytický modul softwaru Local Run Manager zpracovává volání bází prostřednictvím sekundární analýzy. Zpracování zahrnuje demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, volání variant a vykazování. Program pro detekci variant (Pisces) generuje soubory VCF, které obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu, a každou variantu identifikuje jako heterozygotní nebo homozygotní.

## Provozní podmínky

Prvek	Technické údaje
Teplota	Teplotu v laboratoři udržujte v rozmezí 19 až 25 °C (22 °C ±3 °C). Tato teplota je provozní teplotou přístroje. V průběhu sekvenačního běhu zabraňte změnám teploty prostředí o více než ±2 °C.
Vlhkost	Udržujte relativní vlhkost 20–80 % bez kondenzace.

## Vybavení a materiály

### Požadované vybavení a materiály, prodávané samostatně

Sada reagensů NextSeq 550DxHigh Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů), katalogové č. 20028870

Sada reagensů NextSeq 550DxHigh Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů), katalogové č. 20028871

### Požadované vybavení a materiály, nedodané

Uživatelé dodávaný spotřební materiál pro sekvenování

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Čisticí ubrousky se 70% isopropyl alkoholem nebo Ethanol, 70 %	VWR, katalogové číslo 95041-714 (nebo ekvivalentní) Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Čištění průtokové kyvety a obecné použití
Laboratorní utěrky, netkané	VWR, katalogové číslo 21905-026 (nebo ekvivalentní)	Čištění průtokové kyvety a obecné použití

### Spotřební materiál dodaný uživatelem pro účely údržby přístroje

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
NaOCl, 5 % (chlornan sodný)	Sigma-Aldrich, kat. č. 239305 (nebo ekvivalent laboratorní jakosti)	Ruční mytí přístroje po skončení běhu; mycí přípravek zředěný na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, kat. č. P7949	Ruční mytí přístroje; mycí přípravek zředěný na 0,05 %
Voda, laboratorní jakost	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Mytí přístroje (ruční mytí)
Vzduchový filtr	Illumina, katalogové číslo 20022240	Čištění vzduchu nasávaného přístrojem pro účely chlazení

### Pokyny pro vodu laboratorní jakosti

Při provádění postupů na přístroji vždy používejte pouze vodu laboratorní jakosti nebo deionizovanou vodu. Nikdy nepoužívejte kohoutkovou vodu. Používejte pouze vodu následující nebo rovnocenné jakosti:

- ▶ Deionizovaná voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Voda 18 Megaohmů (MΩ)
- ▶ Voda Milli-Q
- ▶ Voda Super-Q
- ▶ Voda pro molekulární biologii

## Varování a preventivní opatření

**UPOZORNĚNÍ** Podle federálních zákonů se prodej tohoto zdravotnického prostředku omezuje na prodej lékařem nebo jiným držitelem povolení k používání tohoto zdravotnického prostředku či vystavení poukazu na tento prostředek v daném státě nebo na prodej na základě jimi vystaveného poukazu.

- 1 **Některé komponenty reagensů poskytnuté společností Illumina pro použití s přístrojem NextSeq 550Dx obsahují potenciálně nebezpečné chemikálie. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního**

**pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensii nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi.** Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 2 Neprodleně nahlaste veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých působí uživatel a pacient.
- 3 Se všemi vzorky krve zacházejte tak, jako by byly infikovány virem lidské imunodeficiency (HIV), lidským virem hepatitidy B (HBV) a dalšími krevními patogeny (univerzální opatření).
- 4 Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- 5 Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagensii používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagensii si důkladně umyjte ruce.
- 6 Dodržujte postupy správné laboratorní praxe a hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci reagensii, nástrojů a genomických vzorků DNA produkty PCR. Kontaminace PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.
- 7 Aby se zabránilo kontaminaci, ujistěte se, že oblasti před amplifikací a po amplifikaci mají specializované vybavení a spotřební materiál (např. pipety, špičky pipet, tepelné bloky, vortexery a centrifugy).
- 8 Párování indexů se vzorky se musí přesně shodovat v tištěném rozvržení desky. Local Run Manager automaticky vyplní indexové primery související s názvy vzorků, když se zadají do modulu. Doporučuje se, aby uživatel před spuštěním běhu sekvenování ověřil spojení indexových primerů a vzorků. Rozdíly mezi vzorky a rozvržením desky vyústí ve špatnou identifikaci pozitivních vzorků a vykázání nesprávných výsledků.
- 9 Velmi se doporučuje, aby si uživatel nainstaloval antivirový software, který bude počítač chránit proti virům. Pokyny k instalaci naleznete v uživatelské příručce.
- 10 Přístroj NextSeq 550Dx nepoužívejte, pokud je z něj sejmut kterýkoliv z krycích panelů. Používání přístroje, když jsou sejmuty některé z panelů, představuje riziko úrazu střídavým nebo stejnosměrným elektrickým proudem.
- 11 Nedotýkejte se průtokové kvety v prostoru průtočné cely. Ohřívač v tomto prostoru může mít teplotu 22 °C až 95 °C a může způsobit popáleniny.
- 12 Přibližná hmotnost přístroje je 84 kg, takže v případě pádu nebo nevhodného zacházení může způsobit vážné poranění osob.

## Návod k použití

Následující návod k použití je určen pro provoz modulů pro analýzu germinálních a somatických variant v diagnostickém režimu na přístroji NextSeq 550Dx pomocí sady reagensii NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) nebo sady reagensii NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).

## Zadání informací o běžích

Podrobné pokyny naleznete v referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513) a v příslušném průvodci modulem Local Run Manager.

### Nastavení parametrů

- 1 Přihlaste se do aplikace Local Run Manager.
- 2 Vyberte **Create Run** (Vytvořit běh) a vyberte **Somatic variant** (Somatická varianta) nebo **Germline Variant** (Germinální varianta).
- 3 Zadejte název běhu, který běh identifikuje od sekvenování až po analýzu. Používejte alfanumerické znaky, mezery, podtržítka nebo pomlčky.
- 4 **[Volitelné]** Pro lepší identifikaci běhu zadejte popis běhu. Používejte alfanumerické znaky, mezery, podtržítka nebo pomlčky.
- 5 V rozevřacím seznamu vyberte počet vzorků a sadu indexů. Při výběru zvažte následující informace.
  - ▶ Rozevřací seznam obsahuje čísla vzorků se sadou indexů. Například 24-sada 1 označuje 24 vzorků, které se mají testovat s indexy ze sady indexů 1.

- ▶ Čísla sad indexů se vztahují k různým sadám párů indexů i5 a i7. Sada 1 i sada 2 poskytuje diverzitu indexů. Aby se zabránilo vyčerpání jedné sady, jsou k dispozici dvě sady indexů.
- ▶ Vyberte počet vzorků, který se co nejvíce blíží počtu vzorků, který testujete. Pokud na seznamu není přesný počet vzorků, vyberte nejbližší číslo, které však bude nižší než počet, který testujete. Když například chcete testovat 18 vzorků, vyberte 16 vzorků.
- ▶ Navržené jamky pro vzorky a kombinace indexů, které splňují požadavky na diverzitu indexů, jsou zvýrazněny zeleně.

### Importování souborů manifestů pro běh

- 1 Ujistěte se, že manifesty, které chcete importovat, jsou dostupné na přístupném umístění v síti nebo na USB disku.
- 2 Vyberte **Import Manifests** (Importovat manifesty).
- 3 Přejděte do souboru manifestů a vyberte manifesty, které chcete přidat.


**POZNÁMKA** Aby byly soubory manifestů dostupné pro všechny běhy za použití modulů pro analýzu germinálních nebo somatických variant, přidejte manifesty pomocí funkce Module Settings (Nastavení modulu). Tato funkce vyžaduje povolení na úrovni administrátora. Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

### Specifikace vzorků pro běh

Pomocí jedné z následujících možností a pokynů specifikujte vzorky pro daný běh.


- ▶ **Ruční zadání vzorků** – Použijte prázdnou tabulku na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu).
- ▶ **Importování vzorků** – Přejděte do externího souboru ve formátu .csv (čárkou oddělené údaje). Na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu) je k dispozici šablona ke stažení.

### Ruční zadání vzorků

- 1 Zadejte unikátní název vzorku (**modul pro analýzu somatických variant**) nebo ID vzorku (**modul pro analýzu germinálních variant**).  
Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
- 2 **[Volitelné]** Pro pozitivní nebo negativní kontrolní vzorky klepněte pravým tlačítkem myši a vyberte typ kontroly. Kontrola jamky jednoho vzorku automaticky vyplní odpovídající jamku v druhém fondu stejnou kontrolou.
- 3 **[Volitelné]** Zadejte popis vzorku do pole Sample Description (Popis vzorku).  
Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
- 4 V rozevřacím seznamu Index 1 (i7) vyberte adaptér Indexu 1.  
Pokud použijete navržené jamky vzorků, software automaticky vyplní indexové adaptéry i5 a i7, které splňují požadavky na diverzitu indexů. Pokud na seznamu není přesný počet vzorků, které testujete, vyberte indexové adaptéry pro extra jamky.
- 5 V rozevřacím seznamu Index 2 (i5) vyberte adaptér Indexu 2.
- 6 V rozevřacím seznamu manifestů vyberte soubor manifestů.  
Vzorky ve fondu A vyžadují jiný manifest než vzorky ve fondu B.
- 7 Vyberte možnost pro zhlédnutí, tisk nebo uložení rozložení desky jako reference pro přípravu knihoven:
  - Pro zobrazení rozvržení desky vyberte ikonu  **Print** (Tisk). Pro tisk rozvržení desky vyberte **Print** (Tisk).
  - Pro export informací o vzorcích do externího souboru vyberte **Export** (Exportovat).
- 8 Vyberte **Save Run** (Uložit běh).

### Importování vzorků

- 1 Vyberte **Import Samples** (Importovat vzorky) a vyhledejte umístění souboru s informacemi o vzorcích. Můžete importovat dva typy souborů.
  - Pro nové rozvržení desky vyberte na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) **Template** (Šablona). Soubor se šablonou obsahuje správné nadpisy sloupců pro importování. K vzorkům v běhu zadejte do každého sloupce informace o vzorku. V nevyužitých buňkách vymažte informace uvedené jako příklad, a poté soubor uložte.

- Pomocí funkce Export použijte soubor s informacemi o vzorku, který se exportoval z modulu pro analýzu germinálních nebo somatických variant.
- 2 Pro zobrazení rozvržení desky vyberte ikonu  **Print** (Tisk).
- 3 Pro tisk rozvržení desky jako reference pro přípravu knihoven vyberte **Print** (Tisk).
- 4 Vyberte **Save Run** (Uložit běh).

## Příprava kazety reagensí

Chcete-li zdárně provést sekvenování, pozorně se řiďte pokyny pro nakládání s kazetou reagensí.

- 1 Ze skladovacích prostor s teplotou od  $-25\text{ °C}$  do  $-15\text{ °C}$  vyjměte kazetu reagensí.
- 2 Některou z následujících metod reagensie rozmrazte. Kazetu neponožujte. Po rozmrazení kazetu vysušte a teprve potom pokračujte na další krok.

Teplota	Doba rozmrazování	Limit stability
Vodní lázeň ( $15\text{ °C}$ až $30\text{ °C}$ )	60 minut	Nesmí přesáhnout 6 hodin
$2\text{ °C}$ až $8\text{ °C}$	7 hodin	Nesmí přesáhnout 5 dnů

**POZNÁMKA** Pokud se ve stejné vodní lázni rozmrazuje více než jedna kazeta, provádějte rozmrazování po delší dobu.

- 3 Pětkrát kazetu obraťte nahoru a dolů, aby se promíchaly reagensie.
- 4 Zkontrolujte dno kazety, zda se reagensie řádně rozmrazily a neobsahují žádné sraženiny. Zaměřte se zvláště na pozice 29, 30, 31 a 32, neboť jsou největší a jejich rozmrazení tvá nejdéle.
- 5 Opatrně kazetou poklepejte o pracovní stůl, abyste snížili počet vzduchových bublinek. Nejlepších výsledků dosáhnete, přikročíte-li pak přímo k vložení vzorku a nastavení běhu.

## Příprava průtokové kyvety

- 1 Ze skladových prostor s teplotou  $2\text{--}8\text{ °C}$  vyjměte krabici s novou průtokovou kyvetou.
- 2 Sejměte balicí fólii a krabici 30 minut ponechte při pokojové teplotě.

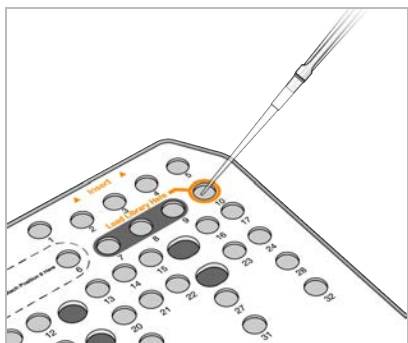
## Příprava knihoven na sekvenování

Denaturujte a zředte knihovny na objem pro vložení 1,3 ml. V praxi může být koncentrace pro vložení různá podle přípravy knihovny a kvantifikačních metod. Ředění vzorků knihoven závisí na tom, nakolik komplexní jsou fondy oligonukleotidů. Pokyny k přípravě vzorků knihovny pro sekvenování včetně ředění a vkládání do fondu naleznete v návodu k použití sady pro přípravu příslušné knihovny. Na přístroji NextSeq 550Dx je třeba optimalizovat hustotu klastru.

## Vložení knihoven do kazety reagensí

- 1 Utěrkou, která nepouští vlákna, odstraňte těsnicí fólii zakrývající zásobník č. 10 označený jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu).
- 2 Těsnění propíchněte špičkou čisté 1ml pipety.
- 3 1,3 ml připravených knihoven vložte do zásobníku č. 10 označeného jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu). Při rozptylování knihoven se nedotýkejte těsnicí fólie.

Obrázek 1 Vložení knihoven



## Nastavení sekvenačního běhu

- 1 K přístroji NextSeq 550Dx se přihlaste svým heslem k softwaru Local Run Manager.
- 2 Na obrazovce Home (Domů) softwaru NOS vyberte **Sequence** (Sekvence).
- 3 Na seznamu vyberte běh, a poté vyberte **Next** (Další).  
V následujícím pořadí se otevře série obrazovek pro nastavení běhu: Load Flow Cell (Vložení průtokové kyvety), Load Buffer Cartridge (Vložení vyrovnávací kazety), Load Reagent Cartridge (Vložení kazety s reagensy), a Pre-run Check (Kontrola před během).
- 4 Když se objeví obrazovka Load Flow Cell (Vložení průtokové kyvety), vyčistěte a vložte průtokovou kyvetu.
  - ▶ Z obalové fólie vyjměte průtokovou kyvetu.
  - ▶ Otevřete průhledné obalové pouzdro z umělé hmoty a vyjměte průtokovou kyvetu
  - ▶ Ubrouskem, který nepouští vlákna a je napuštěn alkoholem, vyčistěte skleněný povrch průtokové kyvety. Sklo osušte laboratorní utěrkou nepouštějící vlákna
  - ▶ Zkontrolujte, zda je skleněný povrch průtokové kyvety opravdu čistý. V případě potřeby čištění opakujte.
  - ▶ Odstraňte průtokovou kyvetu z předchozího běhu.
  - ▶ Zarovnejte průtokovou kyvetu podle zarovnávacích pinů a umístěte ji do snímacího prostoru.
- 5 Vyberte možnost **Load** (Vložit).  
Dvířka se automaticky zavřou, na obrazovce se zobrazí ID průtokové kyvety a proběhne kontrola senzorů.
- 6 Postupujte podle pokynů softwaru a vyprázdněte nádobu od použitých reagensů, vložte vyrovnávací kazetu NextSeq 550Dx a vložte kazetu s reagensy NextSeq 550Dx.  
Když je vyrovnávací kazeta i kazeta s reagensy NextSeq 550Dx vložena, software přečte a zaznamená RFID. Na obrazovce se objeví ID vyrovnávací kazety i kazeta s reagensy a zkontrolují se čidla.
- 7 Až proběhne automatická kontrola před spuštěním běhu, zvolte možnost **Start** (Spustit). (Tento krok není třeba, pokud je nastaveno automatické spuštění.)
- 8 Když se spustí běh, otevře se obrazovka Sequencing (Sekvenování). Tato obrazovka zajišťuje vizuální reprezentaci probíhajícího běhu, a to včetně intenzity a kvalitativních skóre.

## Výsledky

Analýza v reálném čase (RTA) je integrovaný software, který provádí analýzu snímků, volání bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přiřadí kvalitativní skóre. Když primární analýza skončí, vybraný modul Local Run Manager na přístroji NextSeq 550Dx automaticky spustí sekundární analýzu. Zde popsané procesy sekundární analýzy jsou určeny pro moduly pro analýzu germinálních a somatických variant.

## Demultiplexing

Demultiplexing porovnává každou sekvenci čtení indexu se sekvencemi indexu specifikovanými pro běh. V tomto kroku se nezohledňují žádné kvalitativní hodnoty.



Čtení indexu se identifikují pomocí následujících kroků:

- ▶ Vzorky jsou očíslované od 1 podle pořadí, ve kterém jsou uvedené v běhu.
- ▶ Číslo vzorku 0 je rezervováno pro klastry nepřřazené k žádnému vzorku.
- ▶ Klastry se ke vzorku přiřadí, když se sekvence indexu přesně shoduje nebo když se v indexu čtení vyskytuje maximálně jedna neshoda.

## Generování souborů FASTQ

Po demultiplexingu software generuje přechodné analytické soubory ve formátu FASTQ, což je textový formát používaný k reprezentaci sekvencí. Soubory FASTQ obsahují čtení pro každý vzorek a související kvalitativní skóre. Klastry, které neprojdou filtrem, se vyloučí.

Každý soubor FASTQ obsahuje čtení pouze pro jeden vzorek a název tohoto vzorku je v názvu souboru FASTQ. V modulech pro analýzu germinálních a somatických variant se generuje osm souborů FASTQ na vzorek na oligo fond, čtyři ze čtení 1 a čtyři ze čtení 2. Tento výstup vyústí v celkem 8 souborů FASTQ na vzorek pro modul pro analýzu germinálních variant a 16 souborů FASTQ na vzorek pro modul pro analýzu somatických variant. Soubory FASTQ jsou primárním vstupem pro zarovnání.

## Zarovnání

Během kroku zarovnání zarovnáva Smithův-Watermanův algoritmus svazky každého vzorku k sekvencím ampliconů uvedeným v souboru manifestů.

Smithův-Watermanův algoritmus provádí semiglobální zarovnávání sekvencí, aby určil podobné oblasti dvou sekvencí. Namísto porovnání celé sekvence porovnáva Smithův-Watermanův algoritmus segmenty všech možných délek.

Každé čtení paired-end se vyhodnotí ve smyslu zarovnání k příslušným sondovacím sekvencím tohoto čtení.

- ▶ Při vyhodnocení čtení 1 je třeba zohlednit reverzní komplement níže položených lokusově specifických oligonukleotidů (DLSO).
- ▶ Při vyhodnocení čtení 2 je třeba zohlednit výše položené lokusově specifické oligonukleotidy (ULSO).
- ▶ Pokud se začátek čtení shoduje se sondovací sekvencí a není zde více než jeden rozdíl, celá délka čtení se zarovná s cílovým ampliconem této sekvence.
- ▶ Pokud se začátek čtení shoduje se sondovací sekvencí a nejsou zde více než tři rozdíly (rozdíly nebo posuny kvůli hlavním indelům), celá délka čtení se zarovná s cílovým ampliconem této sekvence.
- ▶ Indely v rámci DLSO a ULSO nebyly vzhledem k chemickým vlastnostem rozboru pozorovány.

Na základě frekvence rozdílů buď v oblasti zájmu nebo v celém ampliconu – v závislosti na délce ampliconu – se z výsledků zarovnání filtrují zarovnání. Vyfiltrovaná zarovnání se zapíše do souborů zarovnání jako nezarovnaná a při volání variant se nepoužijí.

## Volání variant

Program pro detekci variant Pisces je určen k tomu, aby pro přístroj připravil SNV a volání indelových variant z knihoven.

## Výkazy a dodatečné výstupní soubory

Moduly pro analýzu variant vytvářejí zprávy ve formátu PDF a \*.txt, které zobrazují metriky, jako je sekvenční hloubka a počty variant. Moduly také generují výstupní soubory, například VCF a gVCF pro aplikace volající varianty.

## Postupy kontroly kvality

Při vyhodnocování každého běhu, vzorku a volání báze bere software NextSeq 550Dx v úvahu metriky kontroly kvality. Pozitivní a negativní kontroly se také doporučují při přípravě knihoven a je třeba je vyhodnotit. Kontroly vyhodnocujte následovně:

- **Negativní kontrola (Žádná kontrola šablony) nebo jiná negativní kontrola** – musí generovat očekávaný výsledek. Pokud negativní kontrola generuje výsledek, který se neočekává, mohla se vyskytnout chyba při sledování vzorků či zaznamenávání indexovacích primerů nebo mohlo dojít ke kontaminaci.
- **Pozitivní kontrolní vzorek** – musí generovat očekávaný výsledek. Pokud pozitivní kontrola generuje výsledek, který se neočekává, mohla se vyskytnout chyba při sledování vzorků či zaznamenávání indexovacích primerů.

## Charakteristiky účinnosti

Výkonnostní charakteristiky přístroje NextSeq 550Dx se stanovily modulem pro analýzu germinálních a somatických variant pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a ověřily pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Studie zahrnovaly indexování vzorků, přenos vzorků, vstup DNA, analytickou citlivost (mez blanku / mez detekce), konzistenci výsledků, porovnání metod a reprodukovatelnost.

Analytické studie pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) byly určeny k hodnocení výkonnostních požadavků dříve stanovených pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Výsledky zjištěné pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx demonstrují, že sady reagensů (v2 a v2.5) mají srovnatelnou výkonnost. Výkonnostní charakteristiky související s pre-analytickými faktory, jako jsou například metody extrakce nebo interferující látky, viz *dokumentace přiložená k sadě TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

## Definice výpočtů používaných ve výkonnostních charakteristikách

- 1 Procento pozitivní shody (PPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako varianty a které rozbor správně vykáže.
  - ▶ (počet lokusů varianty správně vykázaných rozbořem) / (celkový počet lokusů varianty)  
Lokusy varianty vykázané rozbořem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně pozitivní (TP).  
Lokusy varianty vykázané rozbořem jako referenční volání nebo jiné volání variant jsou falešně negativní (FN).
- 2 Procento negativní shody (NPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako divoký typ a které rozbor správně vykáže.
  - ▶ (počet lokusů divokého typu správně vykázaných rozbořem) / (celkový počet lokusů divokého typu)  
Lokusy divokého typu vykázané rozbořem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně negativní (TN). Lokusy divokého typu vykázané rozbořem jako varianty jsou falešně pozitivní (FP).
- 3 Celková procentuální shoda (OPA) se počítá jako poměr lokusů správně vykázaných rozbořem vzhledem k referenční metodě.
  - ▶ ((počet lokusů varianty správně vykázaných rozbořem) + (počet lokusů divokého typu správně vykázaných rozbořem)) / ((celkový počet lokusů varianty) + (celkový počet lokusů divokého typu))
- 4 Výpočty PPA, NPA a OPA nezahnují žádná volání (varianta nebo referenční lokus nespĺňují podmínky jednoho nebo více kvalitativních filtrů).
- 5 Frekvence autozomálního volání se počítá jako celkový počet lokusů, jenž splňuje podmínky filtrů, děleno celkovým počtem pozic sekvenovaných pro chromozomy 1–22: chromozomy X a Y jsou vyloučeny. Tato metrika nezohledňuje shodu volání s referenční metodou.

## Výkonnost sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů)

### Indexování vzorků

Indexovací primery vzorků přidané během přípravy knihoven přiřadí každému vzorku DNA unikátní sekvenci. Tyto unikátní sekvence umožňují sloučit více vzorků do jednoho běhu sekvenování. Indexování vzorků se používá v rámci germinálních i somatických pracovních postupů. Účelem této studie bylo stanovit minimální (8) a maximální (96) počet vzorků, které lze na přístroji NextSeq 550Dx zpracovat v jediném běhu sekvenování. Testovalo se osm unikátních vzorků Platinum Genome s 12 různými kombinacemi indexovacího primeru na vzorek. Výsledky čtyř běhů sekvenování získané modulem pro analýzu germinálních variant se porovnály s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0.

U první sady běhů se knihovny s 96 unikátně indexovanými vzorky testovaly reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech, aby se ověřila schopnost rozboru konzistentně činit u daného vzorku s různými kombinacemi indexovacího primeru genotypová volání. U druhé sady běhů se knihovny s osmi unikátně indexovanými vzorky sekvenovaly ve dvou běžích sekvenování, aby se ověřil minimální počet podporovaných indexů.

U běhů s 96 indexy se SNV pohybovala od 98,7 % do 100 %, PPA pro inserce a delece byla 100 % a NPA pro každou z 96 kombinací indexů 100 %. Běhy s 8 indexy měly hodnoty PPA 100 % (SNV, inserce a delece) a NPA 100 % pro každou z osmi kombinací indexů.

### Přenos vzorků

Přístroj NextSeq 550Dx umožňuje sekvenování více vzorků a kontrol v jediném běhu sekvenování. Byla provedena studie s cílem vyhodnotit rozsah přenosu vzorků v rámci běhu sekvenování a mezi jednotlivými běhy sekvenování. Reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 ampliconů) na 23 různých chromozomech, včetně obou pohlavních chromozomů, se testovaly dva vzorky Platinum Genome, jeden mužský a jeden ženský. Na přístroji NextSeq 550Dx se modulem pro analýzu germinálních variant sekvenovaly knihovny. Přenos mužských vzorků do ženských vzorků byl pozorován v důsledku přítomnosti čtení ampliconu z chromozomu Y v ženských vzorcích.

Přenos v rámci běhu lze provádět během generování klastrů, volání bází indexového cyklu a demultiplexingu vzorků. Za účelem testování přenosu vzorků v rámci běhu sekvenování se fond knihovny sestávající ze 46 replikátů mužských i ženských vzorků a čtyř kontrol bez šablony jednou sekvenoval na přístroji NextSeq 550Dx. Přenos vzorků v rámci běhu se vyhodnotil porovnáním pokrytí každého ženského replikátu amplicony z chromozomu Y s průměrným pokrytím všech mužských replikátů ve fondu amplicony na chromozomu Y. Medián pozorovaný u přenosu v rámci běhu činil 0,084 %.

Za účelem testování přenosu vzorků mezi běhy se připravily dva fondy knihoven, které se postupně sekvenovaly na přístroji NextSeq 550Dx. První fond obsahoval 46 replikátů ženského vzorku a dvě kontroly bez šablony. Druhý fond obsahoval 46 replikátů mužského vzorku a dvě kontroly bez šablony. Oba fondy využily stejnou sadu indexových adaptérů. Nejprve se sekvenoval ženský fond, následovalo sekvenování mužského fondu, a poté další běh sekvenování ženského fondu. Přenos vzorků mezi běhy se vyhodnotil porovnáním pokrytí odpovídajících replikátů opakovaného běhu ženského fondu a běhu mužského fondu amplicony z chromozomu Y. Medián pozorovaný u přenosu mezi běhy činil 0,0076 %.

### Vstup DNA

#### Krev (germinální)

Pro přípravu knihovny na přístroji NextSeq 550Dx pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx s využitím pracovního postupu modulu pro analýzu germinálních variant se stanovil rozsah vstupů DNA krve. Tento rozsah se vyhodnotil provedením sériového ředění 13 vzorků Platinum Genome a reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech. Knihovna se sekvenovala dvěma přístroji NextSeq 550Dx pomocí jedné šarže sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Pět vzorků se testovalo duplicitně na pěti úrovních vstupů DNA v rozsahu od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 12 ng). Osm vzorků se testovalo jako jediný replikát na každé z pěti úrovní vstupů DNA. Pro stanovení přesnosti se vzorové genotypy porovnály s Platinum Genome verze 2016-1.0. Výsledky se stanovily pro každou úroveň vstupu. PPA pro každý typ varianty (SNV, inserce a delece) je uvedeno v [Tabulka 1](#); NPA je uvedeno v [Tabulka 2](#). Všechny úrovně vstupů měly podobnou přesnost. Doporučený vstup DNA pro sadu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng, přičemž 25 ng a 100 ng představují spodní a horní hranici pro splnění výkonnostních charakteristik.

Tabulka 1 PPA – výsledky pro každý vstup DNA podle typu varianty

Vstup DNA (ng)	Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Žádná volání variant	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	Inzerce	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	Delece	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

Tabulka 2 NPA pro každý vstup DNA

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Reference – žádná volání	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 (Somatický)

Pro přípravu knihovny na přístroji NextSeq 550Dx pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx s využitím pracovního postupu modulu pro analýzu somatických variant se stanovil rozsah vstupů DNA fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE). Rozsah vstupů DNA se vyhodnotil provedením sériového ředění třech vzorků Platinum Genome a reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech. Buněčné linie Platinum Genome GM12878 a GM12877 se zafixovaly formalínem, zalily do parafínu, a poté následovala izolace DNA. GM12878 se zředila linií GM12877 tak, aby se alelické frekvence variant (VAF) 81 variant (55 SNV, 10 inzercí a 16 delecí) pohybovaly poblíž 0,025, 0,05 nebo 0,10. Každý vzorek měl dále 91 variant s vyššími frekvencemi variant až po VAF 1,0. Vzorky se zpracovaly duplicitně na pěti úrovních vstupu DNA s průměrným delta kvantitativním cyklem (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 a 7,8 měřeným sadou TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit. Každá knihovna se sekvenovala dvěma přístroji NextSeq 550Dx pomocí dvou sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Pro stanovení přesnosti se volání variant vzorků porovnávalo s Platinum Genome verze 2016-1.0. PPA každého typu varianty (SNV, inzerce a delece) je uvedeno v [Tabulka 3](#); NPA je uvedeno v [Tabulka 4](#). Doporučený vstup DNA pro varianty s VAF 0,05 nebo vyšší je dCq ≤ 4, přičemž pro splnění výkonnostních charakteristik představuje hodnota 4,6 spodní hranici.

Tabulka 3 PPA – výsledky pro každý vstup DNA podle typu varianty

Průměr dCq	Typ varianty	Očekávané varianty	Neočekávaná žádná volání	Cílové ředění VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Žádná volání variant	PPA (%)	Žádná volání variant	PPA (%)	Žádná volání variant	PPA (%)
2,1	SNV	808	Není k dispozici.	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	Inzerce	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	Delece	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

Tabulka 4 NPA pro každý vstup DNA

Průměr dCq	Očekávaný divoký typ	Cílové ředění VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Reference – žádná volání	NPA (%)	Reference – žádná volání	NPA (%)	Reference – žádná volání	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

### Analytická citlivost (Mez blanku [LoB] a mez detekce [LoD])

Tato studie se provedla k vyhodnocení meze blanku (LoB) a meze detekce (LoD) modulu pro analýzu somatických variant na přístroji NextSeq 550Dx. Učinilo se tak reprezentativním rozbořem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech. Buněčné linie Platinum Genome GM12878 a GM12877 se zafixovaly formalinem, zalily do parafínu, a poté následovala izolace DNA. GM12878 se zředila linií GM12877, aby frekvence 74 variant (53 SNV, 7 inzercí a 14 delecí) byla  $0,05 \pm 0,02$ . Linie GM12877 a zředěná linie GM12878 (GM12878-D) se testovaly šest po sobě jdoucích dní na jednom přístroji, přičemž se střídaly dvě šarže sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), a docílilo se tak celkem šesti běhů sekvenování. Tento test vyústil v 60 replikátů každé varianty GM12878-D a 72 replikátů každé odpovídající souřadnice divokého typu v GM12877 pro každou šarži reagentů. LoB a LoD se vypočítaly klasickou metodou pomocí neparametrické možnosti uvedené v CLSI EP17-A2. LoB a LoD se vypočítaly samostatně pro SNV, inzercie a delece, a to sloučením frekvencí variant daného typu varianty do fondu. Chyba I. typu byla definovaná jako 0,01 a chyba II. typu jako 0,05.

U LoB se frekvence variant sloučených do fondu seřadily od nejnižší po nejvyšší a pro každý typ varianty se vypočítala 99. pozice každé šarže reagentie (Tabulka 5). Modul pro analýzu somatických variant využívá ke stanovení kvalitativní detekce variant mezní hodnotu (účinnou LoB) VAF 0,026. Vypočítaná LoB ověřila, že tato mezní hodnota nemá za následek chybu I. typu větší než 0,01.

Tabulka 5 Mez blanku

Typ varianty	Celkový počet pozorování	LoB – šarže reagentií 1 (%)	LoB – šarže reagentií 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Inzerce	504	0,56	0,56
Delece	1008	1,20	1,20

U LoD se vypočítalo procento frekvencí jednotlivých mutací pro každou šarži reagentií a každý typ varianty pod mezní hodnotou 0,026 Tabulka 6. Protože procenta byla nižší než 5% chyba II. typu (0,05), jako LoD se vypočítal medián kombinovaných frekvencí variant (Tabulka 6). Za LoD každého typu varianty se považovala větší ze dvou hodnot vypočítaných pro dvě šarže reagentií – 4,97 % pro SNV, 5,12 % pro inzerce a 5,26 % pro delece.

Tabulka 6 Mez detekce

Šarže reagentií	Typ varianty	Celkový počet pozorování	Počet měření VAF < 2,6 %	% měření VAF < 2,6 %	Mez detekce (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Inzerce	420	6	1,4	5,08
	Delece	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Inzerce	420	5	1,2	5,12
	Delece	840	7	0,80	5,26

## Přesnost

### Germinální

Následující studie byla provedena za účelem posouzení přesnosti volání variant modulu pro analýzu germinálních variant na přístroji NextSeq 550Dx s použitím sady NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Reprezentativním rozбором určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 amplikonů) na 23 různých chromozomech se testovalo 13 jedinečných vzorků Platinum Genome. Během pěti dnů provedli tři operátoři na třech sekvenačních přístrojích se třemi šaržemi reagentií celkem devět běhů. Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genome verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzerce a delecí. Není-li uvedeno jinak, definovaly se na základě této referenční metody spolehlivé oblasti genomu.

Tabulka 7 Souhrn germinální shody

Kritéria	Celkový počet pozorování <sup>1</sup>	Výsledek pozorování <sup>2</sup>	Výsledek běhu <sup>3</sup>
PPA pro SNV	819	98,7	> 99,9
PPA pro inzerce	819	95,0	98,9
PPA pro delece	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Počítáno jako počet vzorků na běh (91) x počet běhů (9) = 819.

<sup>2</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci všech 9 běhů.

<sup>3</sup>Nejnižší hodnota, když se údaje z každého běhu analyzují souhrnně.

**Tabulka 8** uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s Platinum Genome verze 2016-1.0. Kombinují se tři typy variant (SNV, inserce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a insercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 8 Germinální shoda na vzorek

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Očekávané varianty <sup>1</sup>	TP	FN	Žádná volání variant	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

<sup>1</sup> Celkový počet variant ve všech replikátech vzorků v 9 bězích.

**Tabulka 9** uvádí data ze studie prezentované podle vzorků, přičemž se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 9 Germinální shoda na vzorek podle typu varianty

>Vzorek	SNV			Inserce			Delece		
	>Očekávaná hodnota	>TP	>FN	>Očekávaná hodnota	>TP	>FN	Očekávaná hodnota	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

U vzorků se dále analyzovala volání malých insercí a delecí (indelů). Celkový souhrn je uveden v **Tabulka 10**. Celkem se vyskytlo 71 indelů o délce 1–24 bp v případě insercí a o délce 1–25 bp v případě delecí.

Tabulka 10 Souhrn germinální detekce indelů

Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Žádná volání variant	PPA
Inzerce	18522	18018	27	477	99,9
Delece	17388	17073	0	315	100



Reprezentativní rozbor se skládal ze 150 ampliconů zahrnujících různý obsah genomu. Obsah GC ampliconů se pohyboval v rozmezí 0,19–0,87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Aby se stanovil účinek obsahu genomu na procento správných volání, byla data sestavena podle ampliconů (Tabulka 11). Procento správných volání sestává z volání variant a referenčních volání, a pokud se vyskytnou nesprávná nebo žádná volání, je nižší než 100 %.

Tabulka 11 Germinální přesnost na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Není k dispozici	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), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Není k dispozici	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
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	Indel	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	Není k dispozici	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	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), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Není k dispozici	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	Není k dispozici	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	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	Indel	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	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	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	Není k dispozici	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Není k dispozici	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Není k dispozici	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Není k dispozici	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), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	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
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Není k dispozici	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Není k dispozici	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Není k dispozici	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Není k dispozici	0,65	81900	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Není k dispozici	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	Není k dispozici	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	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	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	Není k dispozici	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	Není k dispozici	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Není k dispozici	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	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	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Není k dispozici	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Není k dispozici	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), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x 2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	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	Není k dispozici	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Není k dispozici	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Není k dispozici	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Není k dispozici	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Není k dispozici	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Není k dispozici	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	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	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Není k dispozici	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Není k dispozici	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Není k dispozici	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Není k dispozici	0,55	0	0	0	Není k dispozici
149	Y	2655519	2655609	91	0	Není k dispozici	0,48	0	0	0	Není k dispozici
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Není k dispozici

Výsledky sekvenování vzorku NA12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 amplikonů bylo 92 amplikonů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 genomů mělo částečné překrytí a 17 amplikonů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Pro srovnání tento výsledek vyústil v 10 000 souřadnic na replikát. Nevariantní volání základny se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 12](#).

Tabulka 12 Germinální shoda vzorku NA12878 s databází NIST

Vzorek	Počet amplikonů	Průměrná míra přiřazení	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Na základě údajů získaných touto devítiběžovou germinální studií může přístroj NextSeq 550Dx konzistentně sekvenovat:

- ▶ Obsah GC  $\geq$  19 % (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech se správně volaným 19% obsahem GC a mírou žádných volání 0,6 %)
- ▶ Obsah GC  $\leq$  87 % (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech se správně volaným 87% obsahem GC a nulovou frekvencí žádných volání)
- ▶ Délky Poly A  $\leq$  9 (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování devíti nukleotidů Poly A a nulovou frekvencí žádných volání)
- ▶ Délky Poly T  $\leq$  10 (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování deseti nukleotidů Poly T a nulovou frekvencí žádných volání)
- ▶ Délky Poly G  $\leq$  7 (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování sedmi nukleotidů Poly G a míru žádných volání 1,0 %)
- ▶ Délky Poly C  $\leq$  6 (všechny volané báze v 2457 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování šesti nukleotidů Poly C a nulovou frekvencí žádných volání)
- ▶ Délky opakování dinukleotidů  $\leq$  11 $\times$  (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané 11 $\times$  opakování dinukleotidů a míru žádných volání 0,5 %)
- ▶ Délky opakování trinukleotidů  $\leq$  5 $\times$  (všechny volané báze v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující 5 $\times$  správně volané opakování trinukleotidů a míru žádných volání 0,5 %)
- ▶ Délky inzerce  $\leq$  24 (66343 ze 66370 volaných bází v 819 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volanou 24nukleotidovou inzerci s mírou žádných volání 1,2 %. V oblasti, která obsahuje 24nukleotidovou inzerci, se nevyskytla žádná nesprávná volání)
- ▶ Délky delecí  $\leq$  25 (všechny volané báze v 2457 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volanou 25nukleotidovou delecí a nulovou frekvencí žádných volání)

### Somatická

Pro vyhodnocení přesnosti volání variant modulu pro analýzu somatických variant na přístroji NextSeq 550Dx pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) se použila zde popsaná studie.

Tato studie využila reprezentativní rozbor určený k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 amplikonů) na 23 různých chromozomech. Z bloků FFPE se izoloval Platinum Genome DNA, který generoval šest unikátních vzorků pro vyhodnocení studie.

Vzorek DNA GM12877 se zředil vzorkem DNA GM12878 DNA a vytvořil sadu unikátních heterozygotních variant s frekvencemi variant téměř 5 a 7 % – GM12877-D5 a GM12877-D7. Podobně se vzorek DNA GM12878 zředil vzorkem DNA GM12877, čímž vznikly GM12878-D5 a GM12878-D7. Každý vzorek se testoval trojnásobně, řadě vzorky se testovaly v šesti opakováních. Během pěti dnů provedli tři operátoři na třech sekvenačních přístrojích se třemi šaržemi reagensů celkem devět běhů. Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genomes verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzercí a delecí. Není-li uvedeno jinak, byly spolehlivé genomové oblasti definovány na základě této referenční metody.



Tabulka 13 Souhrn somatické shody

Kritéria	Celkový počet pozorování <sup>1</sup>	Výsledek pozorování <sup>2</sup>	Výsledek běhu <sup>3</sup>
PPA pro SNV	378	98,9	99,9
PPA pro inserce	378	96,9	99,9
PPA pro delece	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Počítáno jako počet vzorků na běh (42) x počet běhů (9) = 378.

<sup>2</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci všech 9 běhů.

<sup>3</sup>Nejnižší hodnota, když se údaje z každého běhu analyzují souhrnně.

**Tabulka 14** uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Kombinují se tři typy variant (SNV, inserce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a insercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnávají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 14 Somatická shoda na vzorek

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Očekávaná hodnota	TP	FN	Žádná volání variant	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

**Tabulka 15** uvádí data ze studie prezentované podle vzorků, přičemž se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 15 Somatická shoda na vzorek podle typu varianty

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

U deseti vzorků se dále analyzovala volání malých inzercí a delecí (indelů) (Tabulka 16). Celkem se vyskytlo 71 indelů o délce 1–24 bp v případě inzercí a o délce 1–25 bp v případě delecí.

Tabulka 16 Souhrn somatické detekce indelů

Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Žádná volání variant	PPA
Inzerce	10773	10282	9	482	99,2
Delece	11502	10667	5	830	> 99,9

K pokrytí různého genomického obsahu bylo určeno 150 ampliconů. Obsah GC ampliconů se pohyboval v rozmezí 0,19–0,87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Aby se stanovil účinek obsahu genomu na procento správných volání, byla data sestavena podle ampliconů (Tabulka 17). Procento správných volání sestává z volání variant a referenčních volání, a pokud se vyskytnou nesprávná nebo žádná volání, je nižší než 100 %.

Tabulka 17 Somatická přesnost na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Není k dispozici	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), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Není k dispozici	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Není k dispozici	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
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	Indel	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	Není k dispozici	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	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), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Není k dispozici	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	Není k dispozici	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	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	Indel	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	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	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	Není k dispozici	0,44	27575	0	28	99,9

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	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	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Není k dispozici	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Není k dispozici	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Není k dispozici	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), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	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
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Není k dispozici	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Není k dispozici	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Není k dispozici	0,45	36105	0	192	99,5

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Není k dispozici	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Není k dispozici	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	Není k dispozici	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	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	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	Není k dispozici	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	Není k dispozici	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Není k dispozici	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	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	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Není k dispozici	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Není k dispozici	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), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x 2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	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

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Není k dispozici	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), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Není k dispozici	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Není k dispozici	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Není k dispozici	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Není k dispozici	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Není k dispozici	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	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	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	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



Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná volání	Nesprávná volání	Žádná volání	% správných volání
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Není k dispozici	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Není k dispozici	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	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	Není k dispozici	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Není k dispozici	0,55	0	0	0	Nepoužívá se
149	Y	2655519	2655609	91	0	Není k dispozici	0,48	0	0	0	Nepoužívá se
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nepoužívá se

Výsledky sekvenování vzorku GM12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 amplikonů bylo 92 amplikonů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 genomů mělo částečné překrytí a 17 amplikonů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Pro srovnání tento výsledek vyústil v 10 000 souřadnic na replikát. Nevariantní volání základny se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 18](#).

Tabulka 18 Somatická shoda vzorku GM12878 s databází NIST

Vzorek	Počet amplikonů	Průměrná míra přiřazení	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Na základě údajů získaných touto devítiběžovou somatickou studií může přístroj NextSeq 550Dx konzistentně sekvenovat:

- ▶ Obsah GC  $\geq$  19 % (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech se správně volaným 19% obsahem GC a mírou žádných volání 2,6 %)
- ▶ Obsah GC  $\leq$  87 % (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech se správně volaným 87% obsahem GC a mírou žádných volání 0,6 %)
- ▶ Délky Poly A  $\leq$  9 (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování sedmi nukleotidů Poly A s mírou žádných volání 2,5 %)
- ▶ Délky Poly T  $\leq$  10 (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování deseti nukleotidů Poly T a míru žádných volání 0,1 %)
- ▶ Délky Poly G  $\leq$  6 (všechny volané báze v 2268 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování šesti nukleotidů Poly G a míru žádných volání 0,5 %)
- ▶ Délky Poly C  $\leq$  6 (všechny volané báze v 756 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané opakování šesti nukleotidů Poly C a míru žádných volání 0,4 %)
- ▶ Délky opakování dinukleotidů  $\leq$  4 $\times$  (všechny volané báze v 1890 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané 4 $\times$  opakování dinukleotidů a míru žádných volání 0,9 %)
- ▶ Délky opakování trinukleotidů  $\leq$  5 $\times$  (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech obsahující 5 $\times$  správně volané opakování trinukleotidů a míru žádných volání 1,4 %)
- ▶ Délky inzerce  $\leq$  23 (všechny volané báze v 378 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volané inzerce 23 nukleotidů a míru žádných volání 0,8 %)
- ▶ Délky delece  $\leq$  25 (všechny volané báze v 1134 sekvenovaných amplikonech obsahující správně volanou 25nukleotidovou delecí a míru žádných volání 0,7 %)

### Konzistence výsledků

Konzistence výsledků přístroje NextSeq 550Dx byla stanovena testováním 13 vzorků Platinum Genome třemi přístroji, třemi šaržemi reagentů a třemi operátory, což v průběhu pěti dnů generovalo devět běhů sekvenování. Reprezentativní rozbor, vzorky a referenční metoda se shodují s rozbohem, vzorky a metodou popsanou u studie germinální přesnosti. Konzistence výsledků se stanovila analýzou rozptylu komponent pomocí VAF jako závisle proměnné a výpočtem směrodatných odchylek na úrovni komponenty pro přístroj, šarži reagentů, operátora a den zahájení ([Tabulka 19](#)). Celkový počet pozorování použitý při analýze každé komponenty variability přístroje, operátora a šarže reagentů byl 699 pro SNV, 176 pro inzerce a 235 pro delece.

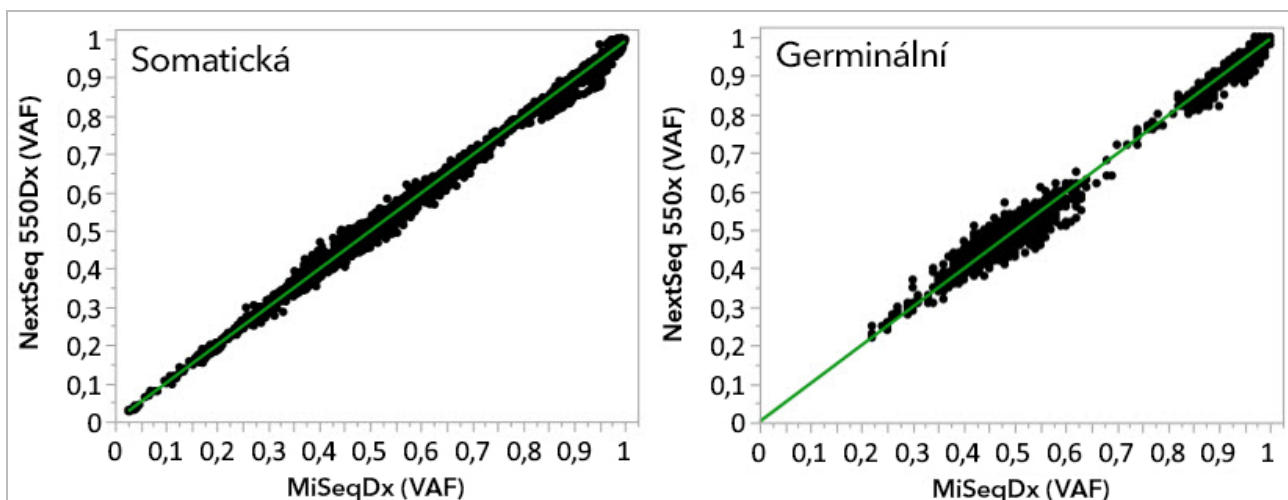
Tabulka 19 Výsledky stanovení konzistence přístroje NextSeq 550Dx (směrodatná odchylka)

Komponenta	Typ varianty	SD komponenty		Celková SD	
		Max	Medián	Max	Medián
Šarže	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inzerce	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delece	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Přístroj	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inzerce	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delece	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operátor	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inzerce	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delece	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Den	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inzerce	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delece	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Porovnání metod (sekvenační platforma)

Na přístroji NextSeq 550Dx a přístroji MiSeqDx se pomocí germinálních a somatických pracovních postupů sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx hodnotila plná krev a vzorky FFPE. Shoda frekvence variant krve a vzorků FFPE se vyhodnotila několika reprezentativními rozborů. **Obrázek 2** znázorňuje korelaci VAF mezi dvěma přístroji v jednom reprezentativním rozboru a **Tabulka 20** shrnuje tuto korelaci podle rozborového panelu. Na základě silné korelace mezi přístrojem MiSeqDx a přístrojem NextSeq 550Dx se zjistilo, že výkonnostní charakteristiky související s pre-analytickými faktory (např. metoda extrakce nebo interferující látky) jsou platné pro oba přístroje. Další podrobnosti viz dokumentace přiložená k sadě TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Obrázek 2 Korelace VAF vzorků FFPE (vlevo) a krve (vpravo) mezi nástroji MiSeqDx a NextSeq 550Dx zjištěná rozborem 1



Tabulka 20 Výsledky porovnání metod pomocí unikátních vzorků krve a FFPE

Zdroj gDNA	Rozbor (Oligo panel)	Biologické replikáty (vzorky)	Technické replikáty (na vzorek)	Pozorování (počet variant)	Sklon	Průsečík	Korelace (R <sup>2</sup> )
Krev	Rozbor 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Krev	Rozbor 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Rozbor 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Rozbor 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Na základě uvedených omezení modulu pro analýzu germinálních variant byly odstraněny dva datové body.

<sup>2</sup>Koeficient determinace grafů VAF ilustrovaný na obrázku 2.

## Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost výsledků přístroje NextSeq 550Dx se hodnotila za použití vzorků Platinum Genome reprezentativním genomem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech pomocí 150 amplikonů. Germinální testování zahrnovalo sedm replikátů 13 vzorků, somatické testování zahrnovalo šest replikátů sedmi vzorků s různými úrovněmi VAF. Vzorky se připravily pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testování se provádělo ve třech externích laboratořích pomocí jedné šarže sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). V každé laboratoři se použil jeden přístroj NextSeq 550Dx. Testování v každé laboratoři prováděli dva operátoři. Každý operátor prováděl testování každého typu vzorku po dobu tří po sobě jdoucích dní, celkem se ve třech laboratořích provedlo 36 běhů. Toto testování vyústilo v 18 běhů pro germinální i somatický pracovní postup.

## Germinální

Germinální varianty s úrovní VAF  $\geq 0,2$  se vykazují jako pozitivní (varianta). U očekávaných pozitivních germinálních variant se u všech typů variant (SNV, inzercí a delecí) hodnotily údaje pro frekvenci žádného volání a míru správného pozitivního volání. **Tabulka 21** shrnuje pozorované frekvence spolu se spodním a horním 95% intervalem spolehlivosti (LCL/UCL) pro každý typ varianty vypočítaným metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 21 Pozorování germinálních volání pro očekávané pozitivní výsledky podle typu varianty

Typ varianty	Žádné volání			Správné pozitivní volání				
	Pozorováno	Celkem	Procento	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Inzerce	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delece	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Germinální varianty s úrovní VAF  $< 0,2$  se vykazují jako negativní (divoký typ). Pro očekávaná negativní germinální umístění se hodnotily údaje zahrnující míru žádného volání a míru správného volání divokého typu. **Tabulka 22** shrnuje pozorované frekvence spolu se spodním a horním 95% intervalem spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítaným metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 22 Pozorování germinálních volání pro očekávané negativní výsledky

Typ varianty	Žádné volání			Správné negativní volání				
	Pozorováno	Celkem	Procento	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
Divoký typ	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Germinální varianty s úrovní VAF  $\geq 0,2$  a  $< 0,7$  se nazývají pozitivní heterozygotní pro variantu a varianty s úrovní VAF  $\geq 0,7$  se nazývají pozitivní homozygotní pro variantu. Ke stanovení, zda inherentní variabilita rozboru ovlivní volání genotypu, se použily germinální vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota Cx, přičemž x je podíl opakovaných testů, které

překračují mezní hodnotu. U spodní mezní hodnoty VAF 0,2 činila hodnota  $C_x \geq 99,999\%$ , což znamená, že  $\geq 99,999\%$  heterozygotních variant se bude nazývat heterozygotními. S ohledem na horní mezní hodnotu VAF 0,7 činila hodnota  $C_x \leq 0,001\%$ , což znamená, že  $\leq 0,001\%$  heterozygotních variant se bude nazývat homozygotními. **Tabulka 23** shrnuje výsledky dle typu varianty.

Germinální varianty s úrovní VAF  $\geq 0,2$  a  $< 0,7$  se nazývají pozitivní heterozygotní pro variantu a varianty s úrovní VAF  $\geq 0,7$  se nazývají pozitivní homozygotní pro variantu. Ke stanovení, zda inherentní variabilita rozboru ovlivní volání genotypu, se použily germinální vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota  $C_x$ , přičemž  $x$  je podíl opakovaných testů, které překračují mezní hodnotu. S ohledem na spodní mezní hodnotu VAF 0,2 činila hodnota  $C_x \geq 99,999\%$ , což znamená, že  $\geq 99,999\%$  heterozygotních variant se bude nazývat heterozygotními. U horní mezní hodnoty VAF 0,7 činila hodnota  $C_x \leq 0,001\%$ , což znamená, že  $\leq 0,001\%$  heterozygotních variant se bude nazývat heterozygotními. **Tabulka 23** shrnuje výsledky dle typu varianty.

Tabulka 23 Germinální hodnoty  $C_x$  pro heterozygotní varianty

Typ varianty	Mezní hodnota VAF 0,2	Mezní hodnota VAF 0,7
	$\geq C_{99,999}\%$	$\leq C_{0,001}\%$
SNV	94/94	94/94
Inzerce	24/24	24/24
Delece	35/35	35/35
Celkem	153	153

### Somatická

Somatické varianty s úrovní VAF  $\geq 0,026$  se vykazují jako pozitivní (varianty). Pozorování s úrovní VAF  $\geq 0,01$  a  $< 0,026$  se pro účely této analýzy považovala za nejednoznačná (ani pozitivní ani negativní, označená jako pozorování s nízkou frekvencí variant). Pro posouzení výkonnosti se výsledky vypočítávaly třemi způsoby:

- ▶ Nejlepší případ: jakýkoliv nejednoznačný výsledek se považoval za správné pozitivní volání (shodu s očekávaným výsledkem)
- ▶ Nejhorší případ: jakýkoliv nejednoznačný výsledek se považoval za nesprávné volání (neshodu s očekávaným výsledkem)
- ▶ Příklad vyloučení: jakýkoliv nejednoznačný výsledek byl z analýzy vyloučen

Tři tabulky, **Tabulka 24**, **Tabulka 25** a **Tabulka 26**, shrnují výsledky volání u nejlepšího případu, nejhoršího případu a případu vyloučení, a to spolu se spodní i horní 95% úrovní spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítanou metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 24 Pozorování somatických volání pro očekávané pozitivní výsledky podle typu varianty (nejlepší případ)

Typ varianty	Správné pozitivní volání				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabulka 25 Pozorování somatických volání pro očekávané pozitivní výsledky podle typu varianty (nejhorší případ)

Typ varianty	Správné pozitivní volání				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabulka 26 Pozorování somatických volání pro očekávané pozitivní výsledky podle typu varianty (odstraněná nejednoznačná volání)

Typ varianty	Správné pozitivní volání				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatické varianty s úrovní VAF < 0,01 se vykazují jako negativní (divoký typ) volání. U očekávaných negativních somatických umístění se hodnotily údaje zahrnující míru žádného volání a míru správného volání divokého typu. Správná volání divokého typu se stanovila vyloučením žádných volání, odečtením pozorovaných volání, která se spadala do nejednoznačné zóny (úroveň VAF  $\geq 0,01$  a < 0,026), a nesprávných volání, která se nacházela nad mezní hodnotou (úroveň VAF  $\geq 0,026$ ). Tabulka 27 shrnuje pozorované, celkové a procentuální výsledky negativních somatických umístění pro míru žádného volání a míru správného volání divokého typu spolu se spodní a horní 95% úrovní spolehlivosti (LCL, UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 27 Pozorování somatických volání pro očekávané negativní výsledky

Typ varianty	Žádné volání			Správné volání						
	Pozorováno	Celkem	Procento	Nejednoznačné	Nesprávné	Správné	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
Divoký typ	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Pro zjištění C95 rozboru (v rámci každého typu varianty) se vyhodnotily somatické vzorky s různými úrovněmi VAF pro stejnou variantu. K vyhodnocení variability poblíž mezní hodnoty rozboru se použily vzorky s očekávanými úrovněmi VAF mezi 0,02 a 0,07. Pro každou variantu se stanovila hodnota C95, nejvyšší hodnoty C95 pro každou variantu jsou uvedeny v Tabulka 28.

Tabulka 28 Souhrn somatických hodnot C95

Typ varianty	N	C95
SNV	74	0,0613
Inzerce	24	0,0573
Delece	33	0,0575

## Výkonnost sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů)

### Přehled

NextSeq 550Dx je podporován dvěma sadami reagentů: sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Aby se demonstrovalo, že sada reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) dokáže splnit požadavky na analytickou výkonnost ověřenou a prokázanou u sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), provedly se studie se sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx se připravily dvě knihovny, jedna s využitím germinálního pracovního postupu a druhá s využitím somatického pracovního postupu. Knihovny vytvořené každým pracovním postupem se testovaly třemi přístroji NextSeq 550Dx a třemi šaržemi sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Testování každého pracovního postupu dále zahrnovalo jeden běh se sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

## Analytická citlivost (Mez blanku [LoB] a mez detekce [LoD])

Ověření se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) ukázalo, že přístroj NextSeq 550Dx dokáže detekovat varianty s VAF 0,05 s chybou II. typu  $\leq 0,05$  a mezní hodnota VAF 0,026 používaná modulem pro analýzu somatických variant (účinná LoB) podporuje chybu I. typu  $\leq 0,01$ . Na základě těchto tvrzení se očekává, že varianta s 0,05 VAF je v 95 % případů častější než s VAF 0,026 a pozice divokého typu má v 99 % případů VAF nižší než 0,026. Aby se potvrdilo, že sada reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) tyto nároky splňuje, provedla se na přístroji NextSeq 550Dx se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) opakovaná měření s divokým typem vzorků (vzorky LoB) a se vzorky obsahujícími varianty s VAF 0,05 (vzorky LoD). Podíl volání nad a pod mezní hodnotou 0,026 se poté porovnal s tvrzeními stanovenými sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Testování zahrnovalo dva vzorky LoD, každý s unikátní sadou variant cílenou na VAF 0,05, a odpovídající vzorky LoB, které byly pro cílené varianty divokým typem. Pro přípravu knihoven se pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx zpracovalo sedm replikátů vzorků LoB a osm replikátů vzorků LoD. Knihovny se nejprve sekvenovaly pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), aby se identifikovaly varianty / genomické souřadnice pro vyhodnocení LoB/LoD pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Na základě výsledků sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) se všechny varianty s průměrnou VAF mezi 0,045–0,055 (varianty LoD) použily pro analýzu LoD (N = 51 variant). U analýzy LoB bylo hodnoceno 51 odpovídajících genomických souřadnic.

Pro vyhodnocení sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se knihovny sekvenovaly ve třech běžích tři po sobě jdoucích dny na stejném přístroji a pomocí stejné šarže sady reagensů. Testování obnášelo 24 replikátů každé z 51 LoD variant a 21 replikátů každé odpovídající pozice divokého typu. Podíl volání divokého typu s VAF  $< 0,026$  je uveden v [Tabulka 29](#). Podíl volání variant LoD s VAF  $\geq 0,026$  je uveden v [Tabulka 30](#).

Tabulka 29 Podíl volání  $< 0,026$  pro pozice divokého typu (vyhodnocení tvrzení LoB)

Typ varianty	Hodnocené pozice	Celkový počet pozorování	Počet měření VAF $\geq 2,6$ %	Podíl $< 2,6$ %	Podíl 95 % Interval spolehlivosti
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Inzerce	11	231	0	1	0,984–1
Delece	8	168	0	1	0,978–1

Tabulka 30 Podíl volání s VAF  $\geq 0,026$  u variant LoD (Hodnocení LoD)

Typ varianty	Hodnocené pozice	Celkový počet pozorování	Počet měření VAF $< 2,6$ %	Počet měření VAF $\geq 2,6$ %	Podíl $\geq 2,6$ %	Podíl 95 % Interval spolehlivosti
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Inzerce	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Delece	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

## Přesnost

### Germinální

Následující studie byla provedena, aby pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotila přesnost volání variant modulu pro analýzu germinálních variant. Pomocí reprezentativního rozboru se testovalo dvanáct jedinečných vzorků Platinum Genome. Za použití tří přístrojů NextSeq 550Dx a třech sad reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se celkem provedlo 11 běhů.

Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genome verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzercí a delecí. Pro referenci jsou uvedeny výsledky přesnosti jednoho běhu sekvenování se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Souhrn výsledků je uveden v [Tabulka 31](#).

Tabulka 31 Souhrn germinální shody

Kritéria	Celkový počet pozorování (v2.5) <sup>1</sup>	Výsledek pozorování (v2.5) <sup>2</sup>	Výsledek pozorování (v2) <sup>3</sup>	Výsledek běhu (v2.5) <sup>4</sup>	Výsledek běhu (v2) <sup>4</sup>
PPA pro SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA pro inserce	1056	100	100	100	98,9
PPA pro delece	1056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Počítáno jako počet vzorků na běh x počet běhů (96 vzorků na běh x 11 běhů = 1056 pozorování).

<sup>2</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků ve všech bězích (na základě 11 běhů se sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci 1 běhu (celkem 96 pozorování).

<sup>4</sup>Nejnižší hodnota, když se údaje z každého běhu analyzují souhrnně.

## Somatická

Pro vyhodnocení přesnosti volání variant modulu pro analýzu somatických variant na přístroji NextSeq 550Dx byla pomocí sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) provedena následující studie. Reprezentativním rozbořem se testovalo deset vzorků FFPE Platinum Genome (dva s variantami zředěnými na VAF 0,05). Za použití tří přístrojů NextSeq 550Dx a třech šarží sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se celkem provedlo 11 běhů.

Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genome verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, insercí a delecí. Pro referenci jsou uvedeny výsledky přesnosti jednoho běhu sekvenování se sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Souhrn výsledků je uveden v [Tabulka 32](#).

Tabulka 32 Souhrn somatické shody

Kritéria	Celkový počet pozorování (v2.5) <sup>1</sup>	Výsledek pozorování (v2.5) <sup>2</sup>	Výsledek pozorování (v2) <sup>3</sup>	Výsledek běhu (v2.5) <sup>4</sup>	Výsledek běhu (v2) <sup>4</sup>
PPA pro SNV	528	100	100	100	100
PPA pro inserce	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA pro delece	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

<sup>1</sup>Počítáno jako počet vzorků na běh x počet běhů (48 vzorků na běh x 11 běhů = 528 pozorování).

<sup>2</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků ve všech bězích (na základě 11 běhů se sadou reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci 1 běhu (celkem 96 pozorování).

<sup>4</sup>Nejnižší hodnota, když se údaje z každého běhu analyzují souhrnně.

## Konzistence výsledků

### Germinální

Pomocí vzorků Platinum Genome a reprezentativního rozboru se vyhodnotila konzistence výsledků sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) s modulem pro analýzu germinálních variant. Testování zahrnovalo přípravu jedné knihovny pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a 12 vzorků, přičemž se každý



zpracoval s osmi replikáty. Za použití tří šarží sad reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) a tří přístrojů NextSeq 550Dx se provedlo celkem devět běhů sekvenování knihoven.

Ke stanovení, zda inherentní variabilita rozboru ovlivní volání genotypu (N = 153 unikátních heterozygotních variant), se použily vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty modulu pro analýzu germinálních variant (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota Cx, přičemž x je podíl opakovaných testů, které překračují mezní hodnotu. U spodní mezní hodnoty VAF 0,2 byla varianta s minimální hodnotou Cx pro sadu reagensů NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) > 99,9 %, což znamená, že > 99,9 % heterozygotních variant bude považováno za heterozygotní. U horní mezní hodnoty VAF 0,7 byla varianta s maximální hodnotou Cx pro sadu reagensů NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) > 1,5 %, což znamená, že > 1,5 % heterozygotních variant bude považováno za homozygotní. **Tabulka 33** shrnuje výsledky dle typu varianty. Pro referenci jsou uvedeny hodnoty Cx z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Tabulka 33 Germinální hodnoty Cx pro heterozygotní varianty

Typ varianty	N	Mezní hodnota VAF 0,2		Mezní hodnota VAF 0,7	
		Min Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Min Cx (v2) <sup>2</sup>	Max Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Max Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Inzerce	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Delece	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

<sup>1</sup>Hodnoty Cx na základě odhadů celkové směrodatné odchylky z analýzy rozptylu komponent.

<sup>2</sup>Hodnoty Cx na základě směrodatné odchylky vzorků.

### Somatická

Pomocí FFPE vzorků Platinum Genome a reprezentativního rozboru se vyhodnotila konzistence výsledků sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) s modulem pro analýzu somatických variant. Testování zahrnovalo přípravu jedné knihovny pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a dva vzorky, přičemž se každý zpracoval s osmi replikáty. S použitím tří sad reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) a tří přístrojů NextSeq 550Dx se provedlo celkem devět běhů sekvenování knihoven.

K vyhodnocení variability přístroje poblíž mezní hodnoty VAF modulu pro analýzu somatických variant (somatické varianty s úrovněmi VAF  $\geq 0,026$  jsou pro variantu pozitivní) se použily somatické varianty s očekávanými úrovněmi VAF  $\leq 0,10$  (N = 131 jedinečných variant). Pro každou somatickou variantu se stanovily hodnoty C95. Hodnoty C95 představují VAF, která má 95% pravděpodobnost, že bude větší než mezní hodnota VAF modulu pro analýzu somatických variant. Nejvyšší hodnoty C95 podle typu varianty jsou uvedeny v **Tabulka 34**. Pro referenci jsou uvedeny výsledky C95 z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Tabulka 34 Souhrn somatických hodnot C95

Typ varianty	Počet hodnocených variant	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Inzerce	24	0,062	0,061
Delece	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>Hodnoty C95 na základě odhadů celkové směrodatné odchylky z analýzy rozptylu komponent.

<sup>2</sup>Hodnoty C95 na základě směrodatné odchylky vzorků.

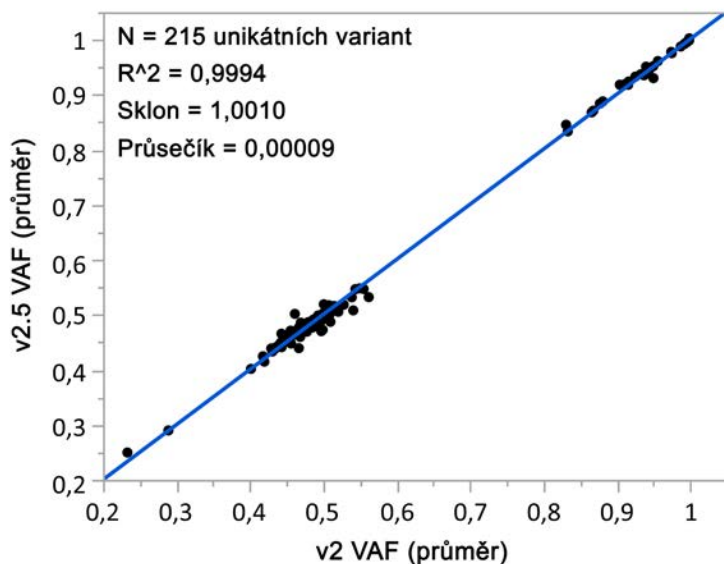
## Porovnání metod (sada reagensů)

### Germinální

Z výsledků generovaných modulem pro analýzu germinálních variant se pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotily průměrné VAF 215 unikátních variant. Průměry VAF se vypočítaly z 11 běhů sekvenování (v2.5) a

jednoho běhu sekvenování (v2). K výpočtu průměru každé varianty se použilo alespoň osm replikátů. **Obrázek 3** znázorňuje korelaci VAF mezi těmito dvěma sadami reagensí. Na základě silné lineární korelace VAF a podobnosti výsledků sad reagensí bylo stanoveno, že výkonnostní charakteristiky původně ověřené a potvrzené sadou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a modulem pro analýzu germinálních variant jsou použitelné pro sadu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).

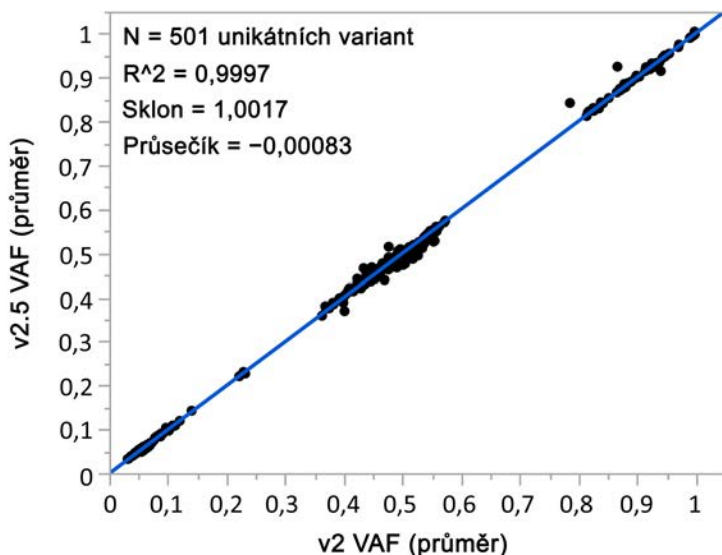
Obrázek 3 Korelace alelické frekvence variant (VAF) modulu germinálních variant mezi sadou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).



### Somatická

Z výsledků generovaných modulem pro analýzu somatických variant se pomocí sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotily průměrné VAF 501 unikátních variant. Průměry VAF se vypočítaly z 11 běhů sekvenování (v2.5) a jednoho běhu sekvenování (v2). K výpočtu průměru každé unikátní varianty se použily alespoň tři replikáty. **Obrázek 4** znázorňuje korelaci VAF mezi těmito dvěma sadami reagensí. Na základě korelace VAF a podobnosti výsledků sad reagensí bylo stanoveno, že výkonnostní charakteristiky ověřené a potvrzené sadou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a modulem pro analýzu somatických variant jsou použitelné pro sadu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).

Obrázek 4 Korelace alelické frekvence variant (VAF) modulu somatických variant mezi sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).



## Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000030326 v06	Květen 2022	Byly provedeny aktualizace za účelem opravy obsahu neúmyslně přidaného ze zdrojového softwaru.
Dokument č. 1000000030326 v05	Listopad 2021	Byla přidána část Varování a preventivní opatření týkající se hlášení závažných událostí. Do části Principy postupu bylo přidáno prohlášení upřesňující zamýšleného uživatele. Byly odebrány informace o sadě reagensů High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Přidány informace o sadě reagensů High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů).
Dokument č. 1000000030326 v04	Srpen 2021	Byla přidána tabulka historie revizí. Aktualizována adresa oprávněného zástupce v EU.

## Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

**NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYŇŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A PŮVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.**

**SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARU).**

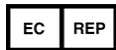
© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktní údaje



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### **Australský sponzor**

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

## Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které se mohou objevit na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů pro vaši sadu na adrese [support.illumina.com](http://support.illumina.com).