

NextSeq™ 550Dx instruments

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM
TIKAI EKSPORTAM

Kataloga Nr. 20005715

Paredzētais lietojums

NextSeq 550Dx instruments ir paredzēts DNS bibliotēku sekvencēšanai, izmantojot ar *in vitro* diagnostikas analīzēm. NextSeq 550Dx instrumentu ir paredzēts izmantot ar noteiktiem reģistrētiem, sertificētiem vai apstiprinātiem *in vitro* diagnostikas reaģentiem un analītisko programmatūru.

Procedūras principi

Illumina NextSeq 550Dx instruments ir paredzēts DNS bibliotēku sekvencēšanai ar *in vitro* diagnostikas analīzēm, un to ir paredzēts lietot tikai kvalificētam un apmācītam klīniskās laboratorijas personālam, kas apmācīts, kā klīniskā laboratorijā veikt *in vitro* diagnostiskas procedūras. Ievadei NextSeq 550Dx izmanto bibliotēkas, kas ir ģenerētas no DNS, kur amplificētiem mērķiem tiek pievienoti paraugu indeksi un uztvertās sekvenču. Paraugu bibliotēkas tiek uztvertas plūsmas elementā un sekvencētas instrumentā, izmantojot sekvencēšanu ar sintēzes (SBS) ķīmiju. SBS ķīmijā tiek izmantota atgriezeniska terminatora metode, lai noteiktu fluorescējoši iezīmētas atsevišķas nukleotīdu bāzes, jo tās ir iekļautas augošās DNS virknēs. Real-Time Analysis (RTA) programmatūra veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze ir pabeigta, instrumentā var izpildīt sekundāro analīzi, lai apstrādātu bāzu noteikšanas gadījumus. Atkarībā no darbplūsmas NextSeq 550Dx izmanto dažādas sekundārās analīzes metodes. Modulim Germline Variant Module un modulim Somatic Variant Module apstrāde ietver demultipleksēšanu, FASTQ failu ģenerēšanu, izlīdzināšanu, variantu noteikšanu un variantu noteikšanas formāta (VCF un gVCF) failu ģenerēšanu. VCF un gVCF failos ir informācija par konkrētās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem.

Duālās palaišanas konfigurācija

NextSeq 550Dx instrumentam ir duālās palaišanas konfigurācija, lai instrumentu varētu lietot vai nu diagnostikas (Dx), vai tikai pētniecības (RUO) režīmā. *In vitro* diagnostikas sekvencēšanas analīzes, tostarp Germline un Somatic Variant Module, tiek izpildītas diagnostikas režīmā. Tikai IVD sekvencēšanas reaģentus var izmantot diagnostikas režīmā. Veiktspējas raksturlielumi un procedūras ierobežojumi NextSeq 550Dx instrumentam ir noteikti, izmantojot Germline un Somatic Variant Module diagnostikas režīmā.

Procedūras ierobežojumi

- 1 Tikai *in vitro* diagnostikas nolūkiem.
- 2 Modulis Germline Variant Module un modulis Somatic Variant Module, tos lietojot ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) vai NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), spēj nodrošināt tālāk norādīto rezultātu.
 - ▶ Sekvencēšanas izvade ≥ 90 gigabāzes (Gb)
 - ▶ Lasījuma garums (izpildē ar sapārotiem galiem) 2 x 150 bāzu pāri (bp)
 - ▶ Bāzes ir vienādas ar vai lielākas par Q30 $\geq 75\%$ pie lasījuma garuma 2 x 150 bp
Vismaz 75% no bāzēm Phred skalas kvalitātes novērtējumi ir ≥ 30 , norādot, ka bāzu noteikšanas akurātums ir lielāks par 99,9%

- 3 Analīzes programmatūra neizvieto lasījumus ar indeliem (insercijām, delēcijām vai kombinācijām), kuru satura garums pārsniedz 25 bp. Rezultātā indeli, kuru garums pārsniedz 25 bp, ar analīzes programmatūru nav konstatējami.
- 4 Analīzes programmatūra var neizvietot amplikonu lasījumus ar ekstrēmu variantu saturu, tādējādi reģions var tikt ziņots kā savvaļas tips. Šādā galējā saturā ietilpst:
 - ▶ lasījumi, kas satur vairāk nekā trīs indelus;
 - ▶ Lasījumi, kuru garums ir vismaz 30 bp, ar atsevišķu nukleotīdu variantu (SNV) saturu > 4% no kopējā amplikona mērķa garuma (izņemot zondes reģionus)
 - ▶ Lasījumi, kuru garums ir < 30 bp, ar SNV saturu > 10% no kopējā amplikona garuma (ieskaitot zondes reģionus)
- 5 Lielu variantu, tostarp multinukleotīdu variantu (MNV) un lielu indeli izvades VCF failā var tikt ziņoti kā atsevišķi mazāki varianti.
- 6 Gadījumos, kad ir aptverti divi pārklājušies amplikoni, delēciju varianti var tikt izfiltrēti vai izlaisti, ja delēcijas garums ir lielāks par vai vienāds ar pārklājumu starp pārklātajiem amplikoniem.
- 7 Sistēma nevar konstatēt indelus, ja tie notiek tieši blakus praimerim un ja nav pārklājoša amplikona. Reģioniem, kuros amplikoni pārklājas, analīze nevar konstatēt delēcijas, ja pārklāšanās reģions ir mazāks par konstatējamās delēcijas lielumu. Piemēram, ja pārklāšanās reģions starp diviem blakus esošiem amplikoniem ir divas bāzes, analīze nevar konstatēt delēcijas, kas ietver šīs abas bāzes. Ir iespējams konstatēt vienu bāzes delēciju jebkurā no šīm bāzēm.
- 8 Tāpat kā jebkurai uz hibridizāciju balstītai bibliotēku sagatavošanas darbplūsmā, zondējamās alēles un sekvencēšanas laikā veikto noteikšanu var ietekmēt pamatā esoši polimorfismi, mutācijas, insercijas vai delēcijas oligonukleotīdus saistošajos reģionos. Tālāk sniegti piemēri.
 - ▶ Variants fāzē ar variantu praimera reģionā var netikt amplificēts, tādējādi tiek iegūts aplami negatīvs rezultāts.
 - ▶ Varianti praimera reģionā var traucēt atsaucē alēles amplifikāciju, tādējādi izraisot nepareizu homozigotiska varianta noteikšanu.
 - ▶ Indelu varianti praimera reģionā var izraisīt kļūdaini pozitīvu noteikšanu lasījuma beigās blakus praimerim.
- 9 Indelus var filtrēt virkņu novirzes dēļ, ja tie rodas tuvu viena lasījuma beigām un ja tiem veikta daļēja salāgošana, nedzēšot nesalāgoto daļu.
- 10 Nelieli MNV nav apstiprināti, un par tiem tiek ziņots tikai somatisko variantu modulī.
- 11 Par delēcijām tiek ziņots VCF failā pie iepriekšējās bāzes koordinātas atkarībā no VCF formāta. Tāpēc izvērtējiet blakus esošos variantus, pirms ziņojat, ka atsevišķa bāze ir noteikta kā homozigotiska atsaucē.
- 12 Dzimumšūnas līnijas ierobežojumi:
 - ▶ NextSeq 550Dx instruments, izmantojot Local Run Manager dzimumšūnas līnijas variantu moduli NextSeq 550Dx, ir paredzēts, lai nodrošinātu kvalitatīvus dzimumšūnas līnijas variantu (piemēram, homozigotisku, heterozigotiskus, savvaļas tipa) noteikšanas rezultātus.
 - ▶ Lietojot kopā ar dzimumšūnas līnijas variantu moduli, minimālais segums uz amplikonu, kas nepieciešams precīzai variantu noteikšanai, ir 150x. Rezultātā ir nepieciešami 150 atbalstoši DNS fragmenti, kas ir ekvivalenti 300 pārklājošiem gala pāru lasījumiem. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
 - ▶ Kopiju skaita variācijas var ietekmēt to, vai variants tiek identificēts kā homozigotisks vai heterozigotisks.
 - ▶ Varianti noteiktā atkārtotā kontekstā tiek izfiltrēti no VCF failiem. Tiek izmantots RMxN atkārtojumu filtrs, lai filtrētu variantus, ja visa varianta vai tā daļas sekvenca atkārtoti parādās atsaucē genomā blakus varianta pozīcijai. Lai atfiltrētu kādu variantu, germinālās līnijas variantu noteikšanas gadījumā atsaucē ir jābūt vismaz deviņiem atkārtojumiem. Tiek ņemti vērā tikai atkārtojumi, kuru garums ir līdz 5 bp (R5x9).
 - ▶ Indels un SNV vienā lokusā var tikt ziņots kā viens variants.
- 13 Somatiskie ierobežojumi.
 - ▶ NextSeq 550Dx instruments, izmantojot Local Run Manager moduli Somatic Variant Module instrumentam NextSeq 550Dx, ir izveidots tā, lai sniegtu kvalitatīvus rezultātus somatisko variantu noteikšanai (piemēram, somatisko variantu klātbūtne, kur varianta frekvence ir lielāka par vai vienāda ar 0,026 ar noteikšanas robežu 0,05).

- ▶ Lietojot kopā ar somatisko variantu moduli, minimālais segums uz amplikonu, kas nepieciešams precīzai variantu noteikšanai, ir 450x uz oligonukleotīdu kopu. Rezultātā ir nepieciešami 450 atbalstoši DNS fragmenti uz oligonukleotīdu kopu, kas ir ekvivalenti 900 pārklājošiem gala pāru lasījumiem. Paraugu skaits un kopējais mērķa bāzu skaits ietekmē segumu. GC saturs un cits genomiskais saturs var ietekmēt segumu.
- ▶ Somatisko variantu noteikšanā ir nepieciešami vismaz seši atkārtojumi atsaucē, lai variants tiktu izfiltrēts, un tiek ņemti vērā tikai tie atkārtojumi, kuru garums nepārsniedz 3 bp (R3x6).
- ▶ Somatisko variantu modulis nevar noteikt atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem. Modulis ir paredzēts, lai konstatētu variantus dažāda variantu biežuma diapazonā, bet variantu biežumu nevar izmantot, lai noteiktu atšķirību starp dzimumšūnas līnijas un somatiskajiem variantiem.
- ▶ Normāli audi paraugā ietekmē variantu konstatēšanu. Ziņotā noteikšanas robeža balstās uz variantu biežumu attiecībā pret kopējo DNS, kas ekstrahēta gan no audzēja, gan no normāliem audiem.

Izstrādājumu komponenti

- 1 NextSeq 550Dx instruments (kataloga Nr. 20005715)
- 2 NextSeq 550Dx instrumenta programmatūras komponenti, tostarp tālāk uzskaitītie.

Programmatūras lietojumprogramma	Funkcija	Apraksts
NextSeq 550Dx vadības programmatūra (NOS)	Kontrolē instrumenta darbību	NOS programmatūras lietojumprogramma pārvalda instrumenta darbību sekvencēšanas laikā un ģenerē attēlus, ko izmanto Real-Time Analysis (RTA) programmatūrai.
Real-time Analysis (RTA) programmatūra	Veic primāro analīzi	RTA programmatūras lietojumprogramma konvertē NOS ģenerētos attēlus katram elementam sekvencēšanas izpildes ciklā par bāzu nosaukšanas failiem, kuri ir ievades Local Run Manager analīzes moduļiem. RTA programmatūras lietojumprogrammai nav lietotāja interfeisa.
Local Run Manager	Interfeiss moduļa atlasīšanai	Local Run Manager programmatūra ir instrumentā iebūvēts risinājums lietotāju pārvaldīšanai, atbilstošā analīzes moduļa atlasīšanai un statusa pārraudzīšanai.
Somatic Variant Module	Veic sekundāro analīzi	Šī Local Run Manager analīzes moduļa programmatūra apstrādā bāzu noteikšanas gadījumus ar sekundāro analīzi. Apstrādē ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, izvietošana, variantu noteikšana un ziņošana. Variantu noteicējs (Pisces) ģenerē VCF failus, kuros ir informācija par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem un ir ietverta izmērītā varianta frekvence.
Germline Variant Module	Veic sekundāro analīzi	Šī Local Run Manager analīzes moduļa programmatūra apstrādā bāzu noteikšanas gadījumus ar sekundāro analīzi. Apstrādē ietilpst demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, izvietošana, variantu noteikšana un ziņošana. Variantu noteicējs (Pisces) ģenerē VCF failus, kuros ir informācija par noteiktās atsauces genoma pozīcijās atrastajiem variantiem un katrs variants ir identificēts kā heterozigotisks vai homozigotisks.

Lietošanas apstākļi

Elements	Specifikācija
Temperatūra	Laboratorijas temperatūra jāuztur diapazonā no 19 °C līdz 25 °C (22 °C ±3 °C). Šī temperatūra ir instrumenta lietošanas temperatūra. Eksploatācijas laikā apkārtējās vides temperatūra nedrīkst svārstīties vairāk par ±2 °C.
Mitrums	Uzturiet nekondensējošu relatīvo gaisa mitrumu diapazonā no 20 līdz 80%.

Aprīkojums un materiāli

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, tiek pārdoti atsevišķi

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cikli), kataloga Nr. 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), kataloga Nr. 20028871

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, kas netiek nodrošināti

Lietotāja nodrošināti palīgmateriāli sekvencēšanas izpildēm

Palīgmateriāls	Piegādātājs	Nolūks
Spirta salvetes, 70 % izopropanols vai etanols, 70 %	VWR, nr. katalogā: 95041-714 (vai līdzvērtīgs izstrādājums) Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Plūsmas šūnu tīrīšanai un vispārīgam pielietojumam
Laboratorijas mazplūksnu salvetes	VWR, nr. katalogā: 21905-026 (vai līdzvērtīgs izstrādājums)	Plūsmas elementu tīrīšanai un vispārīgam pielietojumam

Lietotāja nodrošināti palīgmateriāli instrumenta apkopei

Palīgmateriāls	Piegādātājs	Nolūks
NaOCl, 5% (nātrija hipohlorīts)	Sigma-Aldrich, nr. katalogā 239305 (vai laboratorijas kvalitātes ekvivalents)	Instrumenta mazgāšana, izmantojot manuālo mazgāšanu pēc izpildes; atšķaidīts līdz 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, nr. katalogā P7949	Instrumenta mazgāšana, izmantojot manuālās mazgāšanas iespējas; atšķaidīts līdz 0,05%
Ūdens, laboratorijas kvalitāte	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Instrumenta mazgāšana (manuālā mazgāšana)
Gaisa filtrs	Illumina, nr. katalogā 20022240	Gaisa tīrīšana, ko instruments ievada dzesēšanai

Vadlīnijas par laboratorijas klases ūdeni

Vienmēr izmantojiet laboratorijas klases ūdeni vai dejonizētu ūdeni, lai veiktu procedūras ar instrumentu. Nekad neizmantojiet krāna ūdeni. Izmantojiet tikai tālāk norādīto vai līdzvērtīgu klašu ūdeni:

- ▶ dejonizēts ūdens;
- ▶ Illumina PW1;
- ▶ 18 megomu (MΩ) ūdens;
- ▶ Milli-Q ūdens;
- ▶ Super-Q ūdens;
- ▶ molekulārās bioloģijas klases ūdens.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

UZMANĪBU! Federālie likumi ierobežo šīs ierīces tirdzniecību ārstam vai kas tiek veikta ārsta vai cita ar prakses vietas štata likumiem licencēta speciālista uzdevumā, lietošanu vai ierīces lietošanas pieprasīšanu.

- 1 **Noteiktos Illumina nodrošināto un lietošanai ar NextSeq 550Dx instrumentu paredzēto reaģentu komponentos ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem.** Plašāku informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapās (SDS) vietnē support.illumina.com/sds.html.
- 2 Nekavējoties ziņojiet par jebkādiem nopietniem negadījumiem saistībā ar produktu uzņēmumam Illumina un to dalībvalstu kompetentajām iestādēm, kurā lietotājs un pacients ir reģistrēti.
- 3 Ar visiem asins paraugiem ir jārīkojas tā, it kā būtu zināms, ka tie ir inficēti ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), cilvēka B hepatīta vīrusu (HBV) un citiem ar asinīm pārnēsājamu patogēnu ierosinātājiem (vispārīgi piesardzības pasākumi).
- 4 Neievērojot aprakstītās procedūras, rezultāti var būt kļūdaini vai var ievērojami pasliktināties paraugu kvalitāte.
- 5 Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojoties ar paraugiem un komplekta reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimdus un laboratorijas uzsvārcus. Pēc paraugu un komplekta reaģentu izmantošanas ir rūpīgi jānomazgā rokas.
- 6 Ir nepieciešama pienācīga laboratorijas prakse un laba laboratorijas higiēna, lai PĶR produkti nepiesārņotu reaģentus, instrumentus un genoma DNS paraugus. PCR piesārņojums var izraisīt neprecīzus un neuzticamus rezultātus.
- 7 Lai nepieļautu piesārņojumu, pārliecinieties, ka pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās ir nepieciešamais aprīkojums un palīgmateriāli (piemēram, pipetes, pipešu uzgaļi, sildīšanas bloki, maisītāji un centrifūgas).
- 8 Paraugu pārošanas indeksam ir precīzi jāatbilst drukātajam plates izkārtojuma. Pēc ievadīšanas modulī Local Run Manager automātiski aizpilda ar paraugu nosaukumiem saistītos rādītāju praimerus. Pirms sekvencēšanas izpildes lietotājam ir ieteicams pārbaudīt indeksu praimeru saistību ar paraugiem. Nesakrītības starp paraugu un plates izkārtojuma rezultējas pozitīvas parauga identifikācijas zudumā un nepareizā rezultātu ziņošanā.
- 9 Lai datoru aizsargātu pret vīrusiem, ir ļoti ieteicams instalēt lietotāja sagādātu pretvīrusu programmatūru. Instalēšanas instrukcijas skatiet lietotāja rokasgrāmatā.
- 10 NextSeq 550Dx instrumentu nedrīkst lietot, ja kāds no paneļiem ir noņemts. Ja instruments tiek darbināts, kamēr kāds no paneļiem ir noņemts, pastāv risks saskarties ar līnijas spriegumu un līdzstrāvas spriegumu.
- 11 Nepieskarieties plūsmas elementa kamerai plūsmas elementa nodalījumā. Sildītājs šajā nodalījumā darbojas diapazonā no 22 °C līdz 95 °C un var izraisīt apdegumus.
- 12 Instruments sver aptuveni 84 kg (185 mārciņas) un var radīt nopietnus ievainojumus, ja to nepareizi lieto un ja tas nokrīt.

Lietošanas instrukcija

Tālāk aprakstītās lietošanas instrukcijas ir paredzētas Germline un Somatic Variant Module darbināšanai diagnostikas režīmā NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) vai NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli).

Izpildes informācijas ievade

Detalizētas instrukcijas skatiet NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmatā (dokuments Nr. 100000009513) un piemērojamā Local Run Manager moduļa rokasgrāmatā.

Parametru iestatīšana

- 1 Piesakieties programmatūrā Local Run Manager.
- 2 Atlasiet **Create Run** (Izveidot izpildi) un atlasiet **Somatic Variant** (Somatisko šūnu variants) vai **Germline Variant** (Dzimumšūnu variants).
- 3 Ievadiet izpildes nosaukumu, kas identificē izpildi no sekvencēšanas līdz analīzei. Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojuma vai defises.
- 4 **[Neobligāti]** Ievadiet izpildes aprakstu, lai izpildi būtu vieglāk identificēt. Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojuma vai defises.

- 5 Nolaižamajā sarakstā atlasiet paraugu skaitu un rādījumu kopu. Veicot izvēli, ņemiet vērā tālāk norādīto informāciju.
 - ▶ Nolaižamajā sarakstā ir paraugu skaits ar rādījumu kopu. Piemēram, 24-Set 1 (24 — 1. kopa) norāda 24 testējamus paraugus ar rādījumiem no 1. rādījumu kopas.
 - ▶ Indeksu kopu numuri attiecas uz dažādām i5 un i7 indeksu pāru kopām. Gan 1., gan 2. kopa nodrošina rādītāju dažādību. Lai novērstu vienas kopas noplicināšanu, tiek piedāvātas divas rādījumu kopas.
 - ▶ Izvēlieties paraugu skaitu, kas ir vistuvākais pārbaudāmo paraugu skaitam. Ja sarakstā nav norādīts precīzs paraugu skaits, atlasiet tuvāko, bet mazāku par pārbaudāmo skaitu. Piemēram, ja vēlaties pārbaudīt 18 paraugus, atlasiet 16 paraugus.
 - ▶ Ierosinātās paraugu iedobju un indeksu kombinācijas, kas atbilst indeksu dažādības prasībām, ir izceltas zaļā krāsā.

Izpildes manifestējamo failu importēšana

- 1 Pārliecinieties, vai importējamās manifestācijas ir pieejamā tīkla vietā vai USB diskā.
- 2 Atlasiet **Import Manifests** (Importēt manifestācijas).
- 3 Dodieties uz manifestāciju failu un atlasiet manifestācijas, kuras vēlaties pievienot.


PIEZĪME. Lai manifesta failus padarītu pieejamus visām izpildēm, izmantojot Germline Variant vai Somatic Variant analīzes moduli, pievienojiet manifestus, izmantojot funkciju Module Settings (Moduļa iestatījumi). Šai funkcijai ir vajadzīgas administratora līmeņa lietotāja atļaujas. Papildinformāciju skatiet *NextSeq 550Dx instrumenta atsaucēs rokasgrāmātā (dokumenta Nr. 100000009513)*.

Izpildes paraugu norādīšana


Norādiet izpildes paraugus, izmantojot vienu no opcijām un tālāk esošajiem norādījumiem.

- ▶ **Manuāla paraugu ievade** — izmantojiet tukšo tabulu ekrānā Create Run (Izveidot izpildi).
- ▶ **Paraugu importēšana** — pārejiet uz ārēju failu komatattadlīto vērtību (*.csv) formātā. Ekrānā Create Run (Izveidot izpildi) lejupielādei ir pieejama veidne.

Manuāla paraugu ievade

- 1 Ievadiet unikālu parauga nosaukumu (**Somatic Variant analīzes modulis**) vai parauga ID (**Germline Variant analīzes modulis**).
Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, defises vai pasvītījumus.
- 2 **[Neobligāti]** Pozitīvas vai negatīvas kontroles paraugiem veiciet klikšķi ar peles labo pogu un atlasiet kontroles veidu.
Kontrole vienā parauga nodalījumā automātiski aizpilda atbilstošo nodalījumu otrajā kopā ar tādu pašu kontroli.
- 3 **[Neobligāti]** Ievadiet parauga aprakstu laukā Sample Description (Parauga apraksts).
Izmantojiet burtciparu rakstzīmes, svītras vai pasvītījumus.
- 4 Atlasiet 1. rādītāja adapteri 1. indeksa (i7) nolaižamajā sarakstā.
Kad izmantojat ieteiktos paraugu nodalījumus, programmatūra automātiski norāda i7 un i5 rādītāja adapterus, kas atbilst prasībām par rādītāja daudzveidību. Ja precīzais pārbaudāmo paraugu skaits nav norādīts sarakstā, atlasiet indeksa adapterus papildu nodalījumiem.
- 5 Atlasiet 2. rādītāja adapteri 2. rādītāja (i5) nolaižamajā sarakstā.
- 6 Atlasiet manifesta failu nolaižamajā sarakstā Manifest (Manifests).
A kopā esošiem paraugiem ir nepieciešams cits manifestācija nekā paraugiem B kopā.
- 7 Izvēlieties opciju, lai skatītu, drukātu vai saglabātu plāksnes izkārtojumu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
 - Atlasiet ikonu  **Print** (Drukāt), lai parādītu plāksnes izkārtojumu. Atlasiet opciju **Print** (Drukāt), lai drukātu plāksnes izkārtojumu.
 - Atlasiet opciju **Export** (Eksportēt), lai eksportētu parauga informāciju uz ārējo failu.
- 8 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

Paraugu importēšana

- 1 Atlasiet **Import Samples** (Importēt paraugus) un pārlūkojiet uz vietu, kur atrodas parauga informācijas fails. Var importēt divu veidu failus.
 - Ekrānā Create Run (Izveidot izpildi) atlasiet **Template** (Veidne), lai izveidotu jaunu plates izkārtojumu. Veidnes fails satur pareizus kolonnu virsrakstus importēšanai. Katrā kolonnā ievadiet informāciju par izpildes paraugiem. Izdzēsiet neizmantojamās šūnās esošo piemēru informāciju un pēc tam saglabājiet failu.
 - Izmantojiet parauga informācijas failu, kas tika eksportēts no moduļa Germline Variant vai Somatic Variant, izmantojot funkciju Export (Eksportēt).
- 2 Atlasiet ikonu  **Print** (Drukāt), lai parādītu plates izkārtojumu.
- 3 Atlasiet **Print** (Drukāt), lai izdrukātu plates izkārtojumu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
- 4 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

Reaģentu kasetnes sagatavošana

Lai sekvencēšana noritētu veiksmīgi, noteikti ievērojiet reaģentu kasetnes norādījumus.

- 1 Izņemiet reaģentu kasetni no glabātavas, kuras temperatūra ir no -25°C līdz -15°C .
- 2 Reaģentu atkausēšanai izvēlieties vienu no turpmāk aprakstītajām metodēm. Neiegremdējiet kasetni. Pēc kasetnes atkausēšanas nosusiniet to, pirms veicat nākamo darbību.

Temperatūra	Atkausēšanas laiks	Stabilitātes ierobežojums
Ūdens peldē temperatūrā no 15°C līdz 30°C	60 minūtes	Ne vairāk kā 6 stundas
No 2°C līdz 8°C	7 stundas	Ne vairāk kā 5 dienas

PIEZĪME. Ja vienā ūdens peldē atkausē vairāk nekā vienu kasetni, nodrošiniet papildu atkausēšanas laiku.

- 3 Apgrieziet kasetni piecas reizes, lai sajauktu reaģentus.
- 4 Pārbaudiet kasetnes dibenu, lai pārliecinātos, ka reaģenti ir atkausēti un bez nogulsniem. Pārliecinieties, ka ir atkausēta 29., 30., 31. un 32. pozīcija, jo tās ir vislielākās un kūst visilgāk.
- 5 Lai samazinātu gaisa burbuļu skaitu, viegli piesitiet pie darbgalda.
Lai iegūtu labākos rezultātus, uzreiz ievietojiet paraugu un iestatiet izpildi.

Plūsmas šūnas sagatavošana

- 1 Izņemiet jaunu plūsmas šūnas kasti no glabātavas, kurā temperatūra ir no 2°C līdz 8°C .
- 2 Izņemiet folijas iepakojumu no kastes un 30 minūtes atstājiet to istabas temperatūrā.

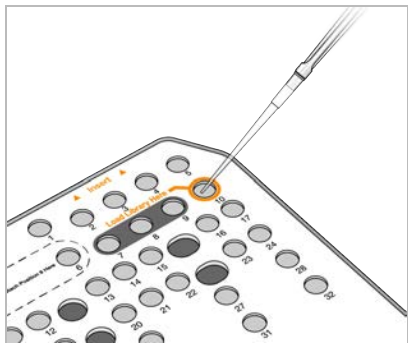
Bibliotēkas sagatavošana sekvencēšanai

Denaturējiet un atšķaidiet bibliotēkas līdz 1,3 ml tilpumam. Praksē ievietošanas koncentrācija var mainīties atkarībā no bibliotēkas sagatavošanas un kvantifikācijas metodēm. Paraugu bibliotēku atšķaidīšana ir atkarīga no oligonukleotīdu kopumu sarežģītības. Norādījumus par to, kā sagatavot paraugu bibliotēkas sekvencēšanai, tostarp par bibliotēku atšķaidīšanu un apkopošanu, skatiet attiecīgajā bibliotēku sagatavošanas komplekta Lietošanas pamācības sadaļā. Klasteru blīvuma optimizācija instrumentā NextSeq 550Dx ir obligāta.

Bibliotēku ievietošana reaģentu kasetnē

- 1 Notīriet 10. rezervuāra folijas plombu, kas marķēta ar uzrakstu **Load Library Here** (Ievietot bibliotēku šeit), izmantojot mazplūksnu salveti.
- 2 Caurduriet plombu ar tīru 1 ml pipetes galu.
- 3 Ievietojiet 1,3 ml sagatavoto bibliotēku 10. rezervuārā, kas marķēts ar uzrakstu **Load Library Here** (Ievietot bibliotēku šeit). Izdalot bibliotēkas, neaiztieciat folijas plombu.

1. attēls Bibliotēku ievietošana



Sekvencēšanas cikla iestatīšana

- 1 Piesakieties NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot savu Local Run Manager programmatūras paroli.
- 2 NOS programmatūras ekrānā Home (Sākums) atlasiet **Sequence** (Sekvence).
- 3 Sarakstā atlasiet kādu izpildi un pēc tam atlasiet **Next** (Tālāk).
Tiek parādīta izpildes iestatīšanas ekrānu sērija šādā secībā: Load Flow Cell (Ievietot plūsmas šūnu), Load Buffer Cartridge (Ievietot buferšķīduma kasetni), Load Reagent Cartridge (Ievietot reaģentu kasetni) un Pre-run Check (Pirmsizpildes pārbaude).
- 4 Kad tiek parādīts ekrāns Load Flow Cell (Ievietot plūsmas šūnu), notīriet un pēc tam ievietojiet plūsmas šūnu.
 - ▶ Izņemiet plūsmas šūnu no folijas iepakojuma.
 - ▶ Atveriet caurspīdīgo plastmasas gliemežvāka formas iepakojumu un izņemiet plūsmas šūnu
 - ▶ Notīriet plūsmas šūnas stikla virsmu ar neplūksnainu spirta salveti. Nosusiniet stiklu ar mazplūksnu salveti
 - ▶ Pārlicinieties, ka plūsmas šūnas stikla virsma ir tīra. Ja nepieciešams, atkātojiet tīrīšanu.
 - ▶ Izņemiet izlietoto plūsmas šūnu no iepriekšējās izpildes.
 - ▶ Nolīdziniet plūsmas elementu virs izlīdzināšanas tapām un novietojiet plūsmas šūnu uz posma.
- 5 Atlasiet **Load** (Ievietot).
Automātiski aizveras durvis, ekrānā parādās plūsmas šūnas ID un tiek pārbaudīti sensori.
- 6 Izpildiet programmatūras norādījumus, lai iztukšotu izlietoto reaģentu konteineru, ievietojiet NextSeq 550Dx buferšķīduma kasetni un ievietojiet NextSeq 550Dx reaģentu kasetni.
Kad NextSeq 550Dx buferšķīduma un reaģentu kasetnes ir ievietotas, programmatūra nolasa un ieraksta šo kasetņu RFID. Buferšķīduma kasetnes un reaģentu kasetnes ID ir redzami ekrānā, un tiek pārbaudīti sensori.
- 7 Kad automatizētā pārbaude pirms izpildes ir pabeigta, atlasiet **Start** (Sākt). (Nav nepieciešams, ja ir iestatīta automatiskā palaišana.)
- 8 Kad tie uzsāka izpildi, tiek atvērta sekvencēšanas ekrāns. Šajā ekrānā ir redzama notiekošā izpilde, tostarp intensitātes un kvalitātes novērtējumi (Q-scores).

Rezultāti

Real-Time Analysis (RTA) ir integrēta programmatūra, kas veic attēlu analizēšanu un bāzu noteikšanu, kā arī piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā sekvencēšanas ciklā. Kad primārā analīze beidzas, atlasītais Local Run Manager modulis NextSeq 550Dx instrumentā automātiski sāk sekundāro analīzi. Šeit aprakstītie sekundārās analīzes procesi ir paredzēti Germline Variant Module un Somatic Variant Module.

Demultipleksēšana

Demultipleksēšana salīdzina katra rādītāja nolasījuma sekvenci ar rādītāja sekvencēm, kas norādītas izpildes sērijai. Šajā darbībā netiek ņemtas vērā kvalitātes vērtības.

Rādītāju nolasījumi tiek identificēti, veicot tālāk norādītās darbības.

- ▶ Paraugi tiek numurēti, sākot no 1, secībā, kādā tie ir uzskaitīti izpildes sērijas veikšanai.
- ▶ Nulles paraugs (0) ir rezervēts klasteriem, kas netika piešķirti paraugam.
- ▶ Klasterus piešķir paraugam, ja rādītāja sekvenca precīzi atbilst vai ja katram rādītāja nolasījumam pastāv ne vairāk kā viena neatbilstība.

FASTQ faila ģenerēšana

Pēc demultipleksēšanas programmatūra ģenerē starpposma analīzes failus FASTQ formātā, kas ir sekvenču attēlošanā izmantots teksta formāts. FASTQ failos ir katra lasījuma paraugi un ar tiem saistītie kvalitātes rādītāji. Kopas, kas netika cauri filtram, tiek izslēgtas.

Katrā FASTQ failā ir lasījumi tikai vienam paraugam, un šī parauga nosaukums ir iekļauts FASTQ faila nosaukumā. Moduļos Germline Variant un Somatic Variant katram paraugam katrā oligo fondā tiek ģenerēti astoņi FASTQ faili — četri no 1. lasījuma un četri no 2. lasījuma. Šī izvade rezultējas 8 FASTQ failos Germline modulim un 16 FASTQ failos Somatic modulim uz paraugu. FASTQ faili ir galvenā salīdzināšanas ievade.

Salīdzināšana

Salīdzināšanas gaitā joslotais Smita–Votermana algoritms salīdzina klasterus no katra parauga ar amplikonu sekvencēm, kas norādītas manifestācijas failā.

Smita-Votermana algoritms salīdzina pusglobālas sekvences, lai divās sekvencēs noteiktu līdzīgus reģionus.

Smita-Votermana algoritms salīdzina nevis kopējo sekvenci, bet visu iespējamo garumu segmentus.

Katru pāra galu nolasījumu novērtē, salīdzinot ar šī nolasījuma attiecīgajām zondes sekvencēm.

- ▶ 1. nolasījums tiek vērtēts, salīdzinot ar lejupvērsto lokusam raksturīgo oligonukleotīdu (Downstream Locus-Specific Oligos — DLSO) atgriezenisko komplementu.
- ▶ 2. nolasījums tiek vērtēts, salīdzinot ar augšupvērstajiem lokusam raksturīgajiem oligonukleotīdiem (Upstream Locus-Specific Oligos — ULSO).
- ▶ Ja lasījuma sākums atbilst zondes sekvencai tā, ka nav vairāk par vienu nesakrītību, viss lasījuma garums tiek izvietots pret amplikona mērķi šai sekvencai.
- ▶ Ja nolasīšanas sākums atbilst zondes sekvencai, kurā nav vairāk kā trīs atšķirības (neatbilstības vai nobīdes vadošo ievietojumu/delēciju dēļ), nolasījuma pilnais garums tiek salīdzināts ar amplikona mērķi šai secībai.
- ▶ Ievietojumi/delēcijas DLSO un ULSO robežās netiek novērotas, ņemot vērā testa izmantotās ķīmiskās vielas.

Salīdzinājumi tiek izfiltrēti no salīdzināšanas rezultātiem, ņemot vērā neatbilstības koeficientus interesējošajā reģionā vai visā amplikonā (atkarībā no amplikona garuma). Filtrētie salīdzinājumi tiek ierakstīti salīdzināšanas failos kā nesalīdzināti un netiek izmantoti variantu noteikšanā.

Varianta noteikšana

Variantu noteicējs Pisces ir izveidots tā, lai veiktu SNV un indelu variantu noteikšanu no instrumentam sagatavotajām bibliotēkām.

Atskaites un papildu izvades faili

Variantu analīzes moduļi izveido PDF un ar tabulēšanas rakstzīmi atdalītas (*.txt) atskaites, kur ir parādītas tādas metrikas kā sekvencēšanas dziļums un variantu skaiti. Šie moduļi izveido arī izvades failus, piemēram, VCF un genoma variantu noteikšanas formāta (genome Variant Call Format — gVCF) failus variantu noteikšanas lietojumprogrammām.

Kvalitātes kontroles procedūras

NextSeq 550Dx programmatūra novērtē katru izpildi, paraugu un bāzu noteikšanu, salīdzinot to ar kvalitātes kontroles metriku. Bibliotēkas sagatavošanā ir ieteicams izmantot arī pozitīvas un negatīvas kontroles, un tās ir nepieciešams novērtēt. Kontroles ir jānovērtē tālāk aprakstītajā veidā.

- **Negatīva kontrole (nav veidnes kontrole) vai cita negatīva kontrole** — tai ir jāģenerē gaidītais rezultāts. Ja negatīvā kontrole ģenerē rezultātu, kas atšķiras no gaidītā, iespējams, ir radusies kļūda parauga izsekošanā, notikusi nepareiza indeksēšanas praimeru reģistrēšana vai piesārņojums.
- **Pozitīvas kontroles paraugs** — tam ir jāģenerē gaidītais rezultāts. Ja pozitīvā kontrole ģenerē rezultātu, kas atšķiras no gaidītā, iespējams, ir radusies kļūda parauga izsekošanā vai ir notikusi nepareiza indeksēšanas praimeru reģistrēšana.

Veiktspējas raksturlielumi

Veiktspējas raksturlielumi NextSeq 550Dx instrumentam tika noteikti, izmantojot moduli Germline Variant Module un Somatic Variant Module ar reaģentu komplektu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx un reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli), un šie raksturlielumi tika apstiprināti, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Pētījumos bija ietverta paraugu indeksēšana, paraugu pārmešana, DNS ievade, analītiskā jutība (tukšā parauga robeža/noteikšanas robeža), akurātums, precizitāte, metožu salīdzinājums un reproducējamība.

Analītiskie pētījumi, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), bija izveidoti tā, lai novērtētu apgalvojumus par veiktspēju, kuri iepriekš bija noteikti ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Rezultāti liecina, ka reaģentu komplektiem (v2 un v2.5) ir salīdzināma veiktspēja, izmantojot komplektu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Lai uzzinātu par veiktspējas raksturlielumiem, kas ir saistīti ar pirmsanalīzes faktoriem, piemēram, par ekstrakcijas metodēm un traucējošajām vielām, skatiet *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx iepakojuma ieliktni*.

Veiktspējas raksturlielumiem izmantoto aprēķinu definīcijas

- 1 Pozitīvā procentuālā sakritība (Positive Percent Agreement — PPA) tiek aprēķināta kā proporcija no analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā variantus.
 - ▶ $(\text{analīzes pareizi ziņoto variantu lokusu skaits}) / (\text{kopējais variantu lokusu skaits})$
Analīzes ziņotie variantu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi pozitīvi (true positive — TP). Variantu lokusi, kurus analīze ziņo kā atsaucis noteikšanas gadījumus vai kā atšķirīgus variantu noteikšanas gadījumus, ir aplami pozitīvi (false positive — FP).
- 2 Negatīvā procentuālā sakritība (Negative Percent Agreement — NPA) tiek aprēķināta kā proporcija no analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem, kurus standartmetode ir klasificējusi kā savvaļas tipus.
 - ▶ $(\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits}) / (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits})$
Analīzes ziņotie savvaļas tipu lokusi, kuri saskan ar standartmetodi, ir patiesi negatīvi (true negative — TN). Savvaļas tipu lokusi, kurus analīze ir ziņojusi kā variantus, ir aplami pozitīvi (false positives — FP).
- 3 Vispārējā procentuālā sakritība (Overall Percent Agreement — OPA) tiek aprēķināta kā proporcija no analīzes pareizi ziņotajiem lokusiem pret standartmetodi.
 - ▶ $((\text{analīzes pareizi ziņoto variantu lokusu skaits}) + (\text{analīzes pareizi ziņoto savvaļas tipu lokusu skaits})) / ((\text{kopējais variantu lokusu skaits}) + (\text{kopējais savvaļas tipu lokusu skaits}))$
- 4 PPA, NPA un OPA aprēķinos nav iekļauti nenoteikšanas gadījumi (kad varianta vai atsaucis lokuss neatbilst vienam vai vairākiem kvalitātes filtriem).
- 5 Autosomu noteikšanas koeficients tiek aprēķināts kā filtrus izturējušo lokusu kopējais skaits, dalīts ar kopējo skaitu pozīciju, kuras ir sekvencētas 1.–22. hromosomai; hromosomas X un Y tiek izslēgtas. Šajā metrikā netiek ņemta vērā noteikšanas sakritība ar standartmetodi.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) veiktspēja

Paraugu indeksēšana

Paraugu indeksu praimeris, kas ir pievienoti bibliotēkas sagatavošanas laikā, katrai parauga DNS piešķir unikālu sekvenci. Šīs unikālās sekvenču lāņ vairākus paraugus apvienot vienā sekvencēšanas izpildē. Paraugu indeksēšana tiek izmantota gan Germline, gan Somatic darbplūsmām. Šī pētījuma mērķis bija noteikt minimālo (8) un maksimālo (96) paraugu skaitu, kādu NextSeq 550Dx instruments var apstrādāt vienā sekvencēšanas izpildē. Astoņi unikāli Platinum Genome paraugi tika testēti ar 12 dažādām indeksēšanas praimeru kombinācijām katram paraugam. Paraugu rezultāti no četrām sekvencēšanas izpildēm, izmantojot Germline Variant Module, tika salīdzināti ar Platinum Genomes versiju 2016-1.0.

Pirmajai izpilžu kopai 96 unikāli indeksētas paraugu bibliotēkas tika testētas ar reprezentatīvu analīzi, kura bija paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes katrai virknei visās 23 cilvēka hromosomās, lai verificētu, ka analīze spēj veikt konsekventu genotipa noteikšanu dotajam paraugam dažādās indeksēšanas praimeru kombinācijās. Otrajai izpilžu kopai astoņas unikāli indeksētas paraugu bibliotēkas tika sekvencētas divās sekvencēšanas izpildēs, lai verificētu minimālo atbalstīto indeksu skaitu.

96 indeksu izpildēm PPA attiecībā uz SNV bija diapazonā no 98,7% līdz 100%, PPA attiecībā uz insercijām un delēcijām bija 100%, un NPA bija 100% katrai no 96 indeksu kombinācijām. 8 indeksu izpildēm PPA vērtības bija 100% (SNV, insercijas un delēcijas), un NPA bija 100% katrai no astoņām indeksu kombinācijām.

Paraugu pārņemšana

NextSeq 550Dx instruments ļauj sekvencēt vairākus paraugus un kontroles vienā sekvencēšanas izpildē. Tika veikts pētījums, lai novērtētu paraugu pārņemšanas apjomu vienā sekvencēšanas izpildē (izpildes robežās) un starp sekvencēšanas izpildēm (starp izpildēm). Divi Platinum Genome paraugi — viens vīriešu un viens sieviešu — tika testēti ar reprezentatīvu analīzi, kura ir paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes (150 amplikonu) 23 dažādās hromosomās, tostarp abu dzimumu hromosomās. Bibliotēku sekvencēšana tika veikta NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot Germline Variant Module. Vīriešu paraugu pārņemšana uz sieviešu paraugiem tika novērota kā Y hromosomas amplikona lasījumu klātesamība sieviešu paraugos.

Pārņemšanu izpildes robežās var izraisīt klasteru ģenerēšanas, indeksu ciklu bāzu noteikšanas un paraugu demultiplēksēšanas laikā. Lai testētu paraugu pārņemšanu vienā sekvencēšanas izpildē, NextSeq 550Dx instrumentā vienu reizi tika sekvencēts bibliotēku fonds, kurš sastāvēja no katra vīriešu un sieviešu parauga 46 replikātiem, plus četrām veidnēs neesošām kontrolēm. Paraugu pārņemšana izpildes robežās tika novērtēta, katra sieviešu replikāta Y hromosomas amplikonu segumu salīdzinot ar visu šajā fondā esošo vīriešu replikātu vidējo Y hromosomas amplikonu segumu. Novērotā mediāna pārņemšanai izpildes robežās bija 0,084%.

Lai testētu paraugu pārņemšanu starp izpildēm, tika sagatavoti divi bibliotēku fondi, un tie tika pēc kārtas sekvencēti vienā NextSeq 550Dx instrumentā. Pirmajā fondā bija 46 sieviešu parauga replikāti un divas veidnēs neesošas kontroles. Otrajā fondā bija 46 vīriešu parauga replikāti un divas veidnēs neesošas kontroles. Abos fondos tika izmantota tā pati indeksu adapteru kopa. Vispirms tika sekvencēts sieviešu fonds, tad notika sekvencēšanas izpilde ar vīriešu fondu un pēc tam vēl viena atkārtota sekvencēšanas izpilde sieviešu fondam. Paraugu pārņemšana starp izpildēm tika novērtēta, Y hromosomas amplikonu segumu salīdzinot starp atbilstošo sieviešu fonda replikātu atkārtoto izpildi un vīriešu fonda izpildi. Novērotā mediāna pārņemšanai starp izpildēm bija 0,0076%.

DNS ievade

Asinis (Germline)

Asiņu DNS ievades diapazons amplikonu komplekta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bibliotēkas sagatavošanai, izmantojot Germline Variant Module darbplūsmu, tika izveidots NextSeq 550Dx instrumentam. Šis diapazons tika novērtēts, veicot atšķaidījumu sērijas pētījumu, kur tika izmantoti 13 Platinum Genome paraugi ar reprezentatīvu analīzi, kura bija paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās. Bibliotēka tika sekvencēta divos NextSeq 550Dx instrumentos, izmantojot vienu partiju reaģentu komplekta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

Pieci paraugi tika testēti divos eksemplāros piecos DNS ievades līmeņos, diapazonā no 250 ng līdz 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng un 12 ng). Astoņi paraugi tika testēti kā viens replikāts katrā no pieciem DNS ievades līmeņiem. Lai noteiktu akurātumu, paraugu genotipi tika salīdzināti ar Platinum Genomes versiju 2016-1.0. Rezultāti tika noteikti katram ievades līmenim. PPA katram varianta tipam (SNV, insercijām un delēcijām) ir parādīta 1. tabula; NPA ir parādīta 2. tabula. Visiem ievades līmeņiem bija līdzīga precizitāte. Ieteicamā DNS ievade amplikonu komplektam TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ir 50 ng, ar 25 ng un 100 ng nodrošinot zemāko un augstāko robežu, lai atbilstu veikspējas raksturlielumiem.

1. tabula PPA rezultāti katrai DNS ievadei pēc varianta tipa

DNS ievade (ng)	Varianta tips	Gaidītie varianti	TP	FN	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Insercija	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Delēcija	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

2. tabula NPA katrai DNS ievadei

DNS ievade (ng)	TN	FP	Atsauces nenoteikšanas gadījumi	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatic)

Formalīnā fiksētās parafīnā ieguldītās (formalin-fixed paraffin-embedded — FFPE) DNS ievades diapazons amplikonu komplekta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bibliotēkas sagatavošanai, izmantojot Somatic Variant Module darbplūsmu, tika izveidots NextSeq 550Dx instrumentam. DNS ievades diapazons tika novērtēts, veicot atšķaidījumu sērijas pētījumu, kur tika izmantoti trīs Platinum Genome paraugi ar reprezentatīvu analīzi, kura bija paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās. Platinum Genome šūnu līnijas GM12878 un GM12877 tika fiksētas formalīnā un iegultas parafīnā, un pēc tam notika DNS ekstrahēšana. Šūnu līnija GM12878 tika atšķaidīta ar GM12877 tā, lai 81 variantam (55 SNV, 10 inserciju un 16 delēciju) varianta alēļu frekvences (variant allele frequency — VAF) būtu pie 0,025, 0,05 vai 0,10. Turklāt katram paraugam bija 91 variants ar augstākām variantu frekvencēm, līdz pat 1,0 VAF. Paraugi tika apstrādāti divos eksemplāros, piecos DNS ievades līmeņos, un vidējais deltas kvantitatīvais cikls (delta quantitative cycle — dCq) bija 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 un 7,8, kā izmērīts ar komplektu TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Katra bibliotēka tika sekvenčēta divos NextSeq 550Dx instrumentos, izmantojot divas partijas reaģentu komplekta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Lai

noteiktu akurātumu, paraugu variantu noteikšana tika salīdzināta ar Platinum Genomes versiju 2016-1.0. PPA katram variantam (SNV, insercijām un delēcijām) ir parādīta 3. tabula; NPA ir parādīta 4. tabula. Ieteicamā DNS ievade variantiem pie 0,05 VAF vai augstākām ir dCq ≤ 4, ar 4,6 nodrošinot zemāku robežu, lai atbilstu veikspējas raksturlielumiem.

3. tabula PPA rezultāti katrai DNS ievadei pēc variantu tipa

Vidējais dCq	Varianta tips	Gaidītie varianti	Netiek gaidīta noteikšana	Mērķa atšķaidījuma VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA (%)	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA (%)	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nav attiecināms.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Insercija	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Delēcija	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

4. tabula NPA katrai DNS ievadei

Vidējais dCq	Gaidītais savvaļas tips	Mērķa atšķaidījuma VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Atsauces nenoteikšanas gadījumi	NPA (%)	Atsauces nenoteikšanas gadījumi	NPA (%)	Atsauces nenoteikšanas gadījumi	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

Analītiskā jutība (tukšā parauga robeža [LoB] un noteikšanas robeža [LoD])

Šis pētījums tika veikts, lai novērtētu tukšā parauga robežu (Limit of Blank — LoB) un noteikšanas robežu (Limit of Detection — LoD) modulim Somatic Variant Module NextSeq 550Dx instrumentā. Tas tika veikts, izmantojot reprezentatīvu analīzi, kura ir paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās. Platinum Genome šūnu līnijas GM12878 un GM12877 tika fiksētas formalīnā un iegultas parafīnā, un pēc tam notika DNS ekstrahēšana. Šūnu līnija GM12878 tika atšķaidīta ar GM12877 tā, lai 74 variantam (53 SNV, 7 inserciju un 14 delēciju) varianta frekvences būtu $0,05 \pm 0,02$. Šūnu līnija GM12877 un atšķaidītā GM12878 (GM12878-D) tika testētas sešas dienas pēc kārtas, izmantojot vienu instrumentu, pārmaiņus izmantojot divas reaģentu komplekta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) partijas, kopā veicot sešas sekvencēšanas izpildes. Šajā testā katrai reaģentu partijai tika izmantoti 60 replikāti katram variantam šūnu līnijā GM12878-D un 72 replikāti katrai atbilstošajai savvaļas tipa koordinātei šūnu līnijā GM12877. LoB un LoD tika aprēķināti, izmantojot klasisko pieeju, kas norādīta CLSI EP17-A2, izmantojot neparametrisko iespēju. LoB un LoD tika aprēķināti SNV, ievietojumiem un dzēsumiem atsevišķi, apvienojot variantu frekvences dotajam varianta tipam. I tipa kļūda bija definēta kā 0,01, un II tipa kļūda bija definēta kā 0,05.

Robežai LoB apkopotās variantu frekvences tika sakārtotas no zemākās uz augstāko, un katram varianta tipam tika aprēķināta 99. ranga pozīcija katrai reaģentu partijai (5. tabula). Lai noteiktu kvalitatīvo variantu noteikšanu, modulis Somatic Variant Module izmanto robežvērtību (faktisko LoB) 0,026 VAF. Aprēķinātā LoB apstiprināja, ka šīs robežvērtības radītā I tipa kļūda nepārsniedz 0,01.

5. tabula Tukšā parauga robeža

Varianta tips	Kopējie novērojumi	LoB 1. reaģenta partija (%)	LoB reaģenta 2. partija (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insercija	504	0,56	0,56
Delēcija	1008	1,20	1,20

Robežai LoD tika aprēķināts katras reaģentu partijas atsevišķās mutācijas frekvences procentuālais daudzums katram variantu tipam, kas ir zemāks par robežvērtību 0,026 (6. tabula). Tā kā procentuālais daudzums bija mazāks par 5% II tipa kļūdu (0,05), kombinēto variantu frekvenču mediāna tika aprēķināta kā LoD (6. tabula). Katra varianta tipa LoD tika pieņemta kā lielākā no abām vērtībām, kas aprēķinātas abām reaģentu partijām — 4,97% attiecībā uz SNV, 5,12% insercijām un 5,26% delēcijām.

6. tabula Noteikšanas robeža

Reaģentu partija	Varianta tips	Kopējie novērojumi	VAF mērījumu skaits < 2,6%	% no VAF mērījumiem < 2,6%	Noteikšanas robeža (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insercija	420	6	1,4	5,08
	Delēcija	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insercija	420	5	1,2	5,12
	Delēcija	840	7	0,80	5,26

Precizitāte

Germline

Tālāk aprakstītais pētījums tika veikts, lai novērtētu Germline Variant Module variantu noteikšanas precizitāti NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Trīspadsmit unikāli Platinum Genome paraugi tika testēti, izmantojot reprezentatīvu analīzi, kas ir paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes (150 amplikonus) 23 dažādās hromosomās. Kopā tika veiktas deviņas izpildes, izmantojot trīs sekvencēšanas instrumentus, trīs reaģentu partijas un trīs operatorus piecās sākšanas dienās. Akurātums attiecībā uz SNV, insercijām un delēcijām tika noteikts, rezultātus salīdzinot ar labi izpētītu kompozītu standartmetodi, Platinum Genomes versiju 2016-1.0. Ja vien nav norādīts citādi, pārliciecinātie genoma reģioni tika definēti, pamatojoties uz šo standartmetodi.

7. tabula Germline sakritības kopsavilkums

Kritēriji	Kopējais novērojumi ¹	Novērotais rezultāts ²	Izpildes rezultāts ³
PPA attiecībā uz SNV	819	98,7	> 99,9
PPA insercijām	819	95,0	98,9
PPA delēcijām	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Aprēķināts kā paraugu skaits vienā izpildē (91) x izpildžu skaits (9) = 819.

²Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta visās 9 izpildēs.

³Viszemākā vērtība, kad dati no katras izpildes tiek analizēti apkopotā veidā.

8. tabula ir pētījuma dati, kas ir parādīti ar pozitīvo un negatīvo procentuālo sakritību katram paraugam, kur varianta rezultāti tiek salīdzināti ar Platinum Genomes versiju 2016-1.0 PPA aprēķiniem. Trīs variantu tipi (SNV, insercijas un delēcijas) ir kombinēti. Tā kā standartmetode nodrošina rezultātus tikai atsevišķiem nukleotīdu variantiem un insercijām/delēcijām, nevarianta bāzu rezultāti tiek salīdzināti ar cilvēka genoma atsaucēs sekvences uzbūvi hg19 NPA aprēķiniem.

8. tabula Germline sakritība katram paraugam

Paraugs	Vidējais noteikšanas ātrums	Gaidītie varianti ¹	TP	FN	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Kopējais variantu skaits visos paraugu replikātos 9 izpildēs.

9. tabula ir pētījuma dati, kas ir parādīti attiecībā uz katru paraugu, kur variantu rezultāti tiek salīdzināti ar labi izpētīto kompozīto standartmetodi. Noteikšana tiek vērtēta katram variantu tipam — SNV, ievietojumiem un dzēsumiem — atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas.

9. tabula Germline sakritība katram paraugam pēc varianta tipa

>Paraugš	SNV			Insercijas			Delēcijas		
	>Gaidītais	>TP	>FN	>Gaidītais	>TP	>FN	Gaidītais	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

Paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu mazas insercijas un delēcijas (indelus). Vispārējais kopsavilkums ir parādīts 10. tabula. Pavisam bija 71 indels, un šo indelu lielums bija diapazonā 1–24 bp insercijām un 1–25 bp delēcijām.

10. tabula Kopsavilkums par Germline indelu noteikšanu

Varianta tips	Gaidītie varianti	TP	FN	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA
Insercija	18522	18018	27	477	99,9
Delēcija	17388	17073	0	315	100

Reprezentatīvā analīze sastāvēja no 150 amplikoniem, kas bija paredzēti, lai aptvertu daudzveidīgu genoma saturu. Amplikonu GC saturs bija diapazonā 0,19–0,87. Amplikoniem bija arī virkne atsevišķu nukleotīdu (piemēram, PolyA, PolyT), dinukleotīdi un trinukleotīdu atkārtojumi. Dati tika apkopoti uz viena amplikona bāzes (11. tabula), lai noteiktu genoma satura ietekmi uz pareizas noteikšanas procentuālo daudzumu. Pareizas noteikšanas procentuālais daudzums sastāv no varianta un atsauces noteikšanas gadījumiem, un, ja pastāv nepareizas noteikšanas vai nenoteikšanas gadījumi, tas ir mazāks par 100%.

11. tabula Germline amplikona līmeņa akurātums

Amplikonss	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36450499	36450591	93	93	Indels	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indels	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indels	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indels	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), indels	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indels	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indels	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indels	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nav	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), indels	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indels	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indels	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indels	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indels	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nav	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indels	0,49	57330	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
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	Indels	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	Nav	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indels	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), indels	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nav	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	Nav	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indels	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	Indels	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	Indels	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indels	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	Indels	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), indels	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	Nav	0,44	59787	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
44	7	66276100	66276187	88	88	Indels	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indels	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indels	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indels	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nav	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indels	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nav	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indels	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indels	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	Indels	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nav	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), indels	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indels	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	Indels	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indels	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nav	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nav	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nav	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indels	0,46	57330	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
69	11	47470345	47470444	100	100	Nav	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indels	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nav	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	Nav	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	Indels	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indels	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), indels	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	Nav	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	Nav	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indels	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indels	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indels	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	Nav	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indels	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indels	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indels	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	Indels	0,62	76986	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indels	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indels	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	Indels	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nav	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indels	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nav	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), indels	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), indels	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indels	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indels	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), indels (x2)	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), indels	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indels	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	Nav	0,37	74529	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indels	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indels	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indels	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nav	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nav	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nav	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nav	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nav	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), indels	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indels	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indels	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	Indels	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indels	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), indels	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indels	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	Indels	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nav	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indels	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nav	0,6	81081	0	0	100

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
144	22	47081347	47081438	92	92	Indels	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nav	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	Nav
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	Nav
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nav

Parauga NA12878 šūnu līnijai sekvencēšanas rezultāti tika salīdzināti ar ļoti pārlicinošu genotipu NA12878 genomam, ko noteica Nacionālais standartu un tehnoloģijas institūts (NIST) (v.2.19). No 150 amplikoniem 92 amplikoni bija pilnībā iekļauti ļoti uzticamajos genoma reģionos, 41 amplikonam bija daļēja pārklāšanās un 17 amplikoniem NIST sekvencē nebija pārklāšanās. Rezultātā salīdzināšanai tika iegūtas 10 000 koordinātes katrā replikātā. Nevariantu bāzu noteikšanas gadījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvences uzbūvi hg19. Akurātuma rezultāti ir parādīti 12. tabula.

12. tabula NA12878 parauga Germline sakritība ar NIST datubāzi

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas ātrums	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Pamatojoties uz šī deviņu izpildītu Germline pētījuma sniegtajiem datiem, NextSeq 550Dx instruments spēj konsekventi sekvencēt tālāk norādītos paraugus.

- ▶ GC saturs $\geq 19\%$ (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos ar 19% GC saturu tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,6%)
- ▶ GC saturs $\leq 87\%$ (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos ar 87% GC saturu tika noteiktas pareizi, un nebija neviena nenoteikšanas gadījuma)
- ▶ PolyA garumi ≤ 9 (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija deviņu nukleotīdu PolyA atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nebija neviena nenoteikšanas gadījuma)
- ▶ PolyT garumi ≤ 10 (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija desmit nukleotīdu PolyT atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nebija neviena nenoteikšanas gadījuma)
- ▶ PolyG garumi ≤ 7 (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija septiņu nukleotīdu PolyG atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 1,0%)
- ▶ PolyC garumi ≤ 6 (visas noteiktās bāzes 2457 sekvencētajos amplikonos, kuros bija sešu nukleotīdu PolyC atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nebija neviena nenoteikšanas gadījuma)
- ▶ Dinukleotīdu atkārojumu garumi $\leq 11x$ (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija 11x nukleotīdu atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,5%)
- ▶ Trinukleotīdu atkārojumu garumi $\leq 5x$ (visas noteiktās bāzes 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija 5x trinukleotīdu atkārojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,5%)
- ▶ Inserciju garumi ≤ 24 (66343 no 66370 noteiktajām bāzēm 819 sekvencētajos amplikonos, kuros bija 24 nukleotīdu insercija, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 1,2%; reģionā, kur bija 24 nukleotīdu insercija, nebija neviena nepareizas noteikšanas gadījuma)
- ▶ Delēciju garumi ≤ 25 (visas noteiktās bāzes 2457 sekvencētajos amplikonos, kuros bija 25 nukleotīdu delēcija, tika noteiktas pareizi, un nebija neviena nenoteikšanas gadījuma)

Somatic

Šeit aprakstītais pētījums tika izmantots, lai novērtētu Somatic Variant Module variantu noteikšanas akurātumu NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

Šajā pētījumā tika izmantota reprezentatīva analīze, kura ir paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes (150 amplikonus) 23 dažādās hromosomās. No blokiem, kas bija apstrādāti ar FFPE, tika ekstrahēta Platinum Genome DNS, lai ģenerētu sešus unikālus paraugus, ko novērtēt šajā pētījumā.

Parauga GM12877 DNS tika atšķaidīta ar parauga GM12878 DNS, lai izveidotu GM12877-D5 un GM12877-D7 kā unikālu heterozigotisku variantu kopu ar variantu frekvencēm pie 5% un 7%. Parauga GM12878 DNS tika līdzīgi atšķaidīta ar parauga GM12877 DNS, lai izveidotu GM12878-D5 un GM12878-D7. Katrs paraugs tika testēts trīs eksemplāros, izņemot atšķaidītos paraugus, kuri tika testēti sešos replikātos. Kopā tika veiktas deviņas izpildes, izmantojot trīs sekvencēšanas instrumentus, trīs reaģentu partijas un trīs operatorus piecās sāksanas dienās. Akurātums attiecībā uz SNV, insercijām un delēcijām tika noteikts, rezultātus salīdzinot ar labi izpētītu kompozītu standartmetodi, Platinum Genomes versiju 2016-1.0. Uzticami genoma reģioni tika definēti, pamatojoties uz šo atsauces metodi, ja vien nav norādīts citādi.

13. tabula Somatic sakrītības kopsavilkums

Kritēriji	Kopējie novērojumi ¹	Novērotais rezultāts ²	Izpildes rezultāts ³
PPA attiecībā uz SNV	378	98,9	99,9
PPA insercijām	378	96,9	99,9
PPA delēcijām	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Aprēķināts kā paraugu skaits vienā izpildē (42) x izpilžu skaits (9) = 378.

²Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta visās 9 izpildēs.

³Viszemākā vērtība, kad dati no katras izpildes tiek analizēti apkopotā veidā.

14. tabula ir pētījuma dati, kas ir parādīti ar pozitīvu un negatīvu procentuālo sakrītību katram paraugam, kur varianta rezultāti tiek salīdzināti ar iedobei raksturīgo kompozīto standartmetodi PPA aprēķiniem. Trīs variantu tipi (SNV, insercijas un delēcijas) ir kombinēti. Tā kā standartmetode nodrošina rezultātus tikai atsevišķiem nukleotīdu variantiem un insercijām/delēcijām, nevarianta bāzu rezultāti tiek salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvenču uzbūvi hg19 NPA aprēķiniem.

14. tabula Somatic sakrītība katram paraugam

Paraugšs	Vidējais noteikšanas ātrums	Gaidītais	TP	FN	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	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

15. tabula ir pētījuma dati, kas ir parādīti attiecībā uz katru paraugu, kur variantu rezultāti tiek salīdzināti ar labi izpētīto kompozīto standartmetodi. Noteikšana tiek vērtēta katram variantu tipam — SNV, ievietojumiem un dzēsumiem — atsevišķi. Atsauces pozīcijas nav iekļautas.

15. tabula Somatic sakrītība katram paraugam pēc varianta tipa

Paraugšs	SNV			Insercijas			Delēcijas		
	Gaidītais	TP	FN	Gaidītais	TP	FN	Gaidītais	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

Paraugs	SNV			Insercijas			Delēcijas		
	Gaidītais	TP	FN	Gaidītais	TP	FN	Gaidītais	TP	FN
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Šie desmit paraugi tika tālāk analizēti, lai noteiktu mazas insercijas un delēcijas (indelus) (16. tabula). Pavisam bija 71 indels, un šo indelu lielums bija diapazonā 1–24 bp insercijām un 1–25 bp delēcijām.

16. tabula Kopsavilkums par Somatic indelu noteikšanu

Varianta tips	Gaidītie varianti	TP	FN	Varianta nenoteikšanas gadījumu skaits	PPA
Insercija	10773	10282	9	482	99,2
Delēcija	11502	10667	5	830	> 99,9

150 amplikoni bija izveidoti tā, lai aptvertu dažādu genoma saturu. Amplikonu GC saturs bija diapazonā 0,19–0,87%. Amplikoniem bija arī virkne atsevišķu nukleotīdu (piemēram, PolyA, PolyT), dinukleotīdu un trinukleotīdu atkārtojumu. Dati tika apkopoti uz viena amplikona bāzes (17. tabula), lai noteiktu genoma satura ietekmi uz pareizas noteikšanas procentuālo daudzumu. Pareizas noteikšanas procentuālais daudzums sastāv no varianta un atsaucēs noteikšanas gadījumiem, un, ja pastāv nepareizas noteikšanas vai nenoteikšanas gadījumi, tas ir mazāks par 100%.

17. tabula Somatic amplikona līmeņa akurātums

Amplikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
1	1	36450499	36450591	93	93	Indels	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indels	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indels	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indels	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), indels	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indels	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indels	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indels	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Nav	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), indels	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indels	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Nav	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indels	0,42	27459	0	136	99,5

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indels	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nav	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indels	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indels	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	Nav	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indels	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), indels	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Nav	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	Nav	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indels	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	Indels	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	Indels	0,63	34730	0	46	99,9

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genomu saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indels	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	Indels	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), indels	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	Nav	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indels	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	Indels	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indels	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indels	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Nav	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indels	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Nav	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indels	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indels	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	Indels	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Nav	0,49	36203	0	85	99,8

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indels	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indels	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	Indels	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indels	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Nav	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Nav	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Nav	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indels	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Nav	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indels	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Nav	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	Nav	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	Indels	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indels	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), indels	0,52	31645	16	525	98,3

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Nav	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	Nav	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indels	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indels	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indels	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	Nav	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indels	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indels	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indels	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indels	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	Indels	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indels	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	Indels	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Nav	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indels	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Nav	0,27	23809	0	5	>99,9

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
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), indels	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), indels	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indels	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indels	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), indels (x2)	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), indels	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indels	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Nav	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), indels	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indels	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indels	0,45	31969	0	161	99,5

Amplifikons	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
123	18	59773996	59774060	65	65	Nav	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Nav	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Nav	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Nav	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Nav	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), indels	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indels	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indels	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	Indels	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indels	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), indels	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indels	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indels	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Nav	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indels	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Nav	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indels	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

Amplikon	Hromosoma	Amplikona sākums	Amplikona beigas	Analizētā fragmenta lielums	Bāzes pārliecinošos reģionos	Amplikona genoma saturs	GC saturs	Pareizas noteikšanas gadījumi	Nepareizas noteikšanas gadījumi	Nenoteikšanas gadījumi	% pareizu noteikšanas gadījumu
147	X	135290777	135290847	71	71	Nav	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nav	0,55	0	0	0	NA
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nav	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	NA

Parauga GM12878 šūnu līnijai sekvenčēšanas rezultāti tika salīdzināti ar ļoti pārliecinošu genotipu NA12878 genomam, ko noteica Nacionālais standartu un tehnoloģijas institūts (NIST) (v.2.19). No 150 amplikoniem 92 amplikoni bija pilnībā iekļauti ļoti pārliecinošos genoma reģionos, 41 amplikonam bija daļēja pārklāšanās un 17 amplikoniem NIST sekvenčē nebija pārklāšanās. Rezultātā salīdzināšanai tika iegūtas 10 000 koordinātes katrā replikātā. Nevariantu bāzu noteikšanas gadījumi tika salīdzināti ar cilvēka genoma atsauces sekvenčes uzbūvi hg19. Akurātuma rezultāti ir parādīti 18. tabula.

18. tabula GM12878 parauga Somatic sakritība ar NIST datubāzi

Paraugs	Amplikonu skaits	Vidējais noteikšanas ātrums	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Pamatojoties uz šī deviņu izpildu Somatic pētījuma sniegtajiem datiem, NextSeq 550Dx instruments spēj konsekventi sekvenčēt tālāk norādītos paraugus.

- ▶ GC saturs $\geq 19\%$ (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos ar 19% GC saturu tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 2,6%)
- ▶ GC saturs $\leq 87\%$ (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos ar 87% GC saturu tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,6%)
- ▶ PolyA garumi ≤ 9 (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija deviņu nukleotīdu PolyA atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 2,5%)
- ▶ PolyT garumi ≤ 10 (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija desmit nukleotīdu PolyT atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija mazāks par 0,1%)
- ▶ PolyG garumi ≤ 6 (visas noteiktās bāzes 2268 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija sešu nukleotīdu PolyG atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,5%)
- ▶ PolyC garumi ≤ 6 (visas noteiktās bāzes 756 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija sešu nukleotīdu PolyC atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,4%)
- ▶ Dinukleotīdu atkātojumu garumi $\leq 4x$ (visas noteiktās bāzes 1890 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija 4x nukleotīdu atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,9%)
- ▶ Trinukleotīdu atkātojumu garumi $\leq 5x$ (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija 5x trinukleotīdu atkātojums, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 1,4%)
- ▶ Insceriju garumi ≤ 23 (visas noteiktās bāzes 378 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija 23 nukleotīdu inscercija, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,8%)
- ▶ Delēciju garumi ≤ 25 (visas noteiktās bāzes 1134 sekvenčētajos amplikonos, kuros bija 25 nukleotīdu delēcija, tika noteiktas pareizi, un nenoteikšanas koeficients bija 0,7%)

Precizitāte

NextSeq 550Dx instrumenta precizitāte tika noteikta, testējot 13 unikālus Platinum Genome paraugus, izmantojot trīs instrumentus, trīs reaģentu partijas un trīs operatorus, lai ģenerētu deviņas sekvenčēšanas izpildes piecās sākšanas dienās. Reprezentatīva analīze, paraugi un standartmetode ir tie paši, kas aprakstīti Germline akurātuma pētījumā. Ietekme uz precizitāti tika noteikta ar dispersijas komponenta analīzi, izmantojot VAF kā atbildes mainīgo un komponenta līmenī aprēķinot standartnovirzes instrumentam, reaģentu partijai, operatoram un sākšanas dienai (19. tabula). Kopējais instrumenta, operatora vai reaģentu partijas katra komponenta analīzei izmantotais novērojumu skaits SNV, inscercijām un delēcijām attiecīgi bija 699, 176 un 235.

19. tabula Precizitātes rezultāti NextSeq 550Dx instrumentam (standartnovirze (SD))

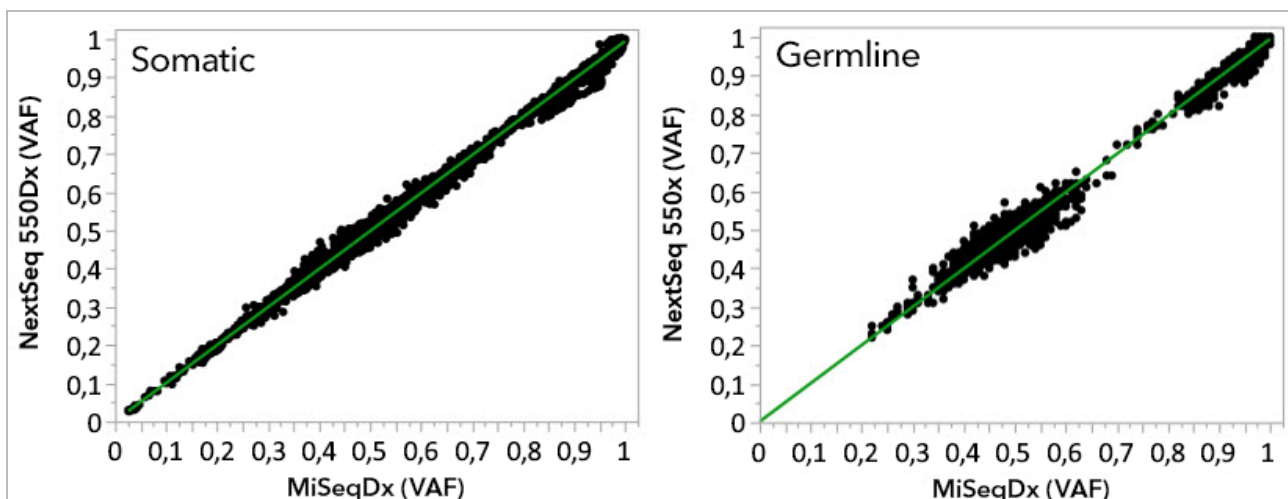
Komponents	Varianta tips	Komponenta SD		Kopējā SD	
		Maks.	Mediāna	Maks.	Mediāna
Partija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inscercija	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delēcija	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187

Komponents	Varianta tips	Komponenta SD		Kopējā SD	
		Maks.	Mediāna	Maks.	Mediāna
Iekārta	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insercija	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delēcija	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operators	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insercija	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delēcija	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Diena	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insercija	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delēcija	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Metožu salīdzinājums (sekvencēšanas platforma)

Pilnasiņu un FFPE paraugi tika novērtēti NextSeq 550Dx instrumentā un MiSeqDx instrumentā, izmantojot TruSeq Custom Amplicon Kit Dx Germline un Somatic darbplūsmas. Variantu frekvenču sakrītība asiņu un FFPE paraugiem tika novērtēta, izmantojot vairākas reprezentatīvas analīzes. [2. attēls](#) ir parādīta VAF korelācija starp abiem instrumentiem vienai reprezentatīvajai analīzei, un [20. tabula](#) ir šīs korelācijas kopsavilkums pēc analīzes paneļa. Balstoties uz izteikto korelāciju starp MiSeqDx instrumentu un NextSeq 550Dx instrumentu, veiktspējas raksturojumi, kas ir saistīti ar pirmsanalīzes faktoriem (piem., ekstrakcijas metodes un traucējošās vielas), tiek uzskatīti par piemērojamiem abiem instrumentiem. Plašāku informāciju skatiet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx iepakojuma ieliktņā.

2. attēls VAF korelācija starp MiSeqDx instrumentu un NextSeq 550Dx instrumentu attiecībā uz FFPE (pa kreisi) un asiņu (pa labi) paraugiem, izmantojot 1. analīzi



20. tabula Metožu salīdzinājuma rezultāti, izmantojot unikālus asiņu un FFPE paraugus

gDNA avots	Analīze (oligo panelis)	Bioloģiskie replikāti (paraugi)	Tehniskie replikāti (katram paraugam)	Novērojumi (variantu skaits)	Sīpums	Krustošānās	Korelācija (R ²)
Asinis	1. analīze	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Asinis	2. analīze	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	1. analīze	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	3. analīze	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Divi datu punkti tika noņemti, pamatojoties uz modulim Germline Variant Module norādīto ierobežojumu.

²Noteikšanas koeficients VAF apgabaliem, kā parādīts 2. attēlā.

Reproducējamība

NextSeq 550Dx instrumenta reproducējamība tika novērtēta, izmantojot Platinum Genome paraugus ar reprezentatīvu analīzi, kura bija paredzēta dažādu gēnu meklēšanai, aptverot 12 588 bāzes 23 dažādās hromosomās, izmantojot 150 amplikonus. Germline testēšana sastāvēja no septiņiem 13 paraugu replikātiem; Somatic testēšana sastāvēja no sešiem septiņu paraugu replikātiem dažādos VAF līmeņos. Paraugi tika sagatavoti, izmantojot komplektu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testēšana tika veikta trīs ārējos centros, izmantojot vienu partiju reaģentu komplekta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Katrā centrā tika izmantots viens NextSeq 550Dx instruments. Katrā centrā testēšanu veica divi operatori. Katrs operators veica testēšanu trīs neseicīgās sākšanas dienās katram paraugu tipam, un kopā tika veiktas 36 izpildes trīs centros. Šajā testēšanā tika veiktas 18 izpildes katrai Germline un Somatic darbplūsmi.

Germline

Germline varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,2$, tiek ziņoti kā pozitīva (variāta) noteikšana. Gaidītajiem pozitīvajiem Germline variantiem dati tika novērtēti nenoteikšanas koeficientam un pareizas noteikšanas koeficientam katrā variāta tipā (SNV, insercija, delēcija). 21. tabula ir kopsavilkums par novērotajiem koeficientiem, kopā ar zemāko pārliecības līmeni (lower confidence level — LCL) un augstāko 95% pārliecības līmeni (upper confidence level — UCL), kuri tiek aprēķināti, izmantojot Vilsona novērtēšanas metodi, katram variāta tipam.

21. tabula Germline noteikšanas novērojumi gaidītajiem pozitīvajiem rezultātiem pēc variāta tipa

Variāta tips	Nenoteikšana			Pareiza pozitīva noteikšana				
	Novērotais	Kopā	Procenti	Novērotais	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Insercijas	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delēcijas	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Germline varianti, kuru VAF līmenis ir $< 0,2$, tiek ziņoti kā negatīvi (savvaļas tips). Germline atrašanās vietām, kur tika gaidīti negatīvi rezultāti, dati tika novērtēti nenoteikšanas koeficientam un pareizas savvaļas tipa noteikšanas koeficientam. 22. tabula ir kopsavilkums par novērotajiem koeficientiem, kopā ar zemāko pārliecības līmeni (lower confidence level — LCL) un augstāko 95% pārliecības līmeni (upper confidence level — UCL), kuri tiek aprēķināti, izmantojot Vilsona novērtēšanas metodi.

22. tabula Germline noteikšanas novērojumi, kad tiek gaidīti negatīvi rezultāti

Variāta tips	Nenoteikšana			Pareiza negatīva noteikšana				
	Novērotais	Kopā	Procenti	Novērotais	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
Savvaļas tips	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Germline varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,2$ un $< 0,7$, tiek noteikti kā pozitīvi heterozigotiski attiecīgajam variantam, un varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,7$, tiek noteikti kā pozitīvi homozigotiski attiecīgajam variantam. Lai noteiktu, vai analīzei piemītošais mainīgums ietekmē genotipa noteikšanu, tika izmantoti Germline paraugi ar heterozigotiskiem variantiem. Cx vērtība tika noteikta abām robežvērtībām (0,2 heterozigotiskiem un 0,7 homozigotiskiem genotipiem), kur x ir robežvērtību pārsniedzšo atkārtoto testu proporcija. Zemākajai robežvērtībai 0,2 VAF Cx vērtība bija $\geq 99,999\%$, norādot, ka $\geq 99,999\%$ heterozigotisko variantu tiktu noteikti kā heterozigotiski. Augšējai robežvērtībai 0,7 VAF Cx vērtība bija $\leq 0,001\%$, tādējādi norādot, ka $\leq 0,001\%$ heterozigotisko variantu tiktu noteikti kā homozigotiski. **23. tabula** ir rezultātu kopsavilkums pēc varianta tipa.

Germline varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,2$ un $< 0,7$, tiek noteikti kā pozitīvi heterozigotiski attiecīgajam variantam, un varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,7$, tiek noteikti kā pozitīvi homozigotiski attiecīgajam variantam. Lai noteiktu, vai analīzei piemītošais mainīgums ietekmē genotipa noteikšanu, tika izmantoti Germline paraugi ar heterozigotiskiem variantiem. Cx vērtība tika noteikta abām robežvērtībām (0,2 heterozigotiskiem un 0,7 homozigotiskiem genotipiem), kur x ir robežvērtību pārsniedzšo atkārtoto testu proporcija. Zemākajai robežvērtībai 0,2 VAF Cx vērtība bija $\geq 99,999\%$, tādējādi norādot, ka $\geq 99,999\%$ heterozigotisko variantu tiktu noteikti kā heterozigotiski. Augstākajai robežvērtībai 0,7 VAF Cx vērtība bija $\leq 0,001\%$, norādot, ka $\leq 0,001\%$ heterozigotisko variantu tiktu noteikti kā homozigotiski. **23. tabula** ir rezultātu kopsavilkums pēc varianta tipa.

23. tabula Germline Cx vērtības heterozigotiskiem variantiem

Varianta tips	Robežvērtība pie 0,2 VAF	Robežvērtība pie 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insercijas	24/24	24/24
Delēcijas	35/35	35/35
Kopā	153	153

Somatic

Somatic varianti, kuru VAF līmeņi ir $\geq 0,026$, tiek ziņoti kā pozitīva (varianta) noteikšana. Šīs analīzes nolūkos novērojumi, kur VAF līmeņi bija $\geq 0,01$ un $< 0,026$, tika uzskatīti par neviennozīmīgiem (ne pozitīviem, ne negatīviem, šādi novērojumi tika atzīmēti kā zema variantu frekvence). Lai novērtētu veiktspēju, rezultāti tika aprēķināti trīs tālāk aprakstītajos veidos.

- ▶ Labākais gadījums: visi neviennozīmīgie rezultāti tika uzskatīti par pareizu pozitīvu noteikšanu (sakrītība ar gaidītajiem rezultātiem)
- ▶ Sliktākais gadījums: visi neviennozīmīgie rezultāti tika uzskatīti par nepareizu noteikšanu (nesakrītība ar gaidītajiem rezultātiem)
- ▶ Izslēgšanas gadījums: visi neviennozīmīgie rezultāti tika izslēgti no analīzes

Trīs tabulās, **24. tabula**, **25. tabula** un **26. tabula**, ir sniegts kopsavilkums par noteikšanas rezultātiem attiecīgi labākajam gadījumam, sliktākajam gadījumam un izslēgšanas gadījumam, kopā ar zemāko pārliecības līmeni (lower confidence level — LCL) un augstāko 95% pārliecības līmeni (upper confidence level — UCL), kuri tiek aprēķināti, izmantojot Vilsona novērtēšanas metodi.

24. tabula Somatic noteikšanas novērojumi gaidītajiem pozitīvajiem rezultātiem pēc varianta tipa (labākais gadījums)

Varianta tips	Pareiza pozitīva noteikšana				
	Novērotais	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insercijas	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delēcijas	18 381	18 381	100	99,98	100,00

25. tabula Somatic noteikšanas novērojumi gaidītajiem pozitīvajiem rezultātiem pēc varianta tipa (sliktākais gadījums)

Varianta tips	Pareiza pozitīva noteikšana				
	Novērotais	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insercijas	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delēcijas	18 381	18 381	100	99,98	100,00

26. tabula Somatic noteikšanas novērojumi gaidītajiem pozitīvajiem rezultātiem pēc varianta tipa (neviennozīmīgi noteikšanas gadījumi tiek izslēgti)

Varianta tips	Pareiza pozitīva noteikšana				
	Novērotais	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insercijas	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delēcijas	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatic varianti, kuru VAF līmenis ir $< 0,01$, tiek ziņoti kā negatīva (savvaļas tipa) noteikšana. Somatic atrašanās vietām, kur tika gaidīti negatīvi rezultāti, dati tika novērtēti nenoteikšanas koeficientam un pareizas savvaļas tipa noteikšanas koeficientam. Pareizas savvaļas tipa noteikšanas gadījumi tika noteikti, izslēdzot nenoteikšanas gadījumus un atņemot novērotos noteikšanas gadījumus, kas ietilpa neviennozīmīgajā zonā (VAF līmeņi $\geq 0,01$ un $< 0,026$), kā arī nepareizas noteikšanas gadījumus, kas bija virs robežvērtības (VAF līmeņi $\geq 0,026$) no kopējā.

27. tabula ir sniegts kopsavilkums par novērotajiem, kopīgajiem un procentuālajiem rezultātiem negatīvajām Somatic atrašanās vietām nenoteikšanas koeficientam un pareizas savvaļas tipa noteikšanas koeficientam, kopā ar zemāko pārliecības līmeni (lower confidence level — LCL) un augstāko 95% pārliecības līmeni (upper confidence level — UCL), kuri tiek aprēķināti, izmantojot Vilsona novērtēšanas metodi.

27. tabula Somatic noteikšanas novērojumi, kad tiek gaidīti negatīvi rezultāti

Varianta tips	Nenoteikšana			Pareiza noteikšana						
	Novērotais	Kopā	Procenti	Neviennozīmīgi	Nepareizi	Pareizi	Kopā	Procenti	95% LCL	95% UCL
Savvaļas tips	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Tika novērtēti Somatic paraugi ar dažādiem VAF līmeņiem tam pašam variantam, lai noteiktu analīzes C95 (katrā varianta tipā). Lai novērtētu mainīgumu analīzes robežvērtības tuvumā, tika izmantoti paraugi, kuros gaidāmie VAF līmeņi bija no 0,02 līdz 0,07. C95 tika noteikts katram variantam, un augstākais C95 katram varianta tipam ir ziņots 28. tabula.

28. tabula Somatic C95 kopsavilkums

Varianta tips	N	C95
SNV	74	0,0613
Insercija	24	0,0573
Delēcija	33	0,0575

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) veikspēja

Pārskats

NextSeq 550Dx instrumentu atbalsta divi reaģentu komplekti: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) un NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Lai demonstrētu, ka NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) spēj atbilst analītiskās veikspējas prasībām, kuras ir verificētas un validētas ar NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli), tika veikti pētījumi ar NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Tika veiktas divas bibliotēku sagatavošanas, izmantojot TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, viena — ar Germline darbplūsmu, un otra — ar Somatic darbplūsmu. Bibliotēkas no katras darbplūsmas tika testētas ar trīs NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) partijām, izmantojot trīs NextSeq 550Dx instrumentus. Turklāt katras darbplūsmas testēšanā ietilpa viena izpilde ar NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

Analītiskā jutība (tukšā parauga robeža [LoB] un noteikšanas robeža [LoD])

Verificēšana ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) demonstrēja, ka NextSeq 550Dx instruments var konstatēt variantus pie 0,05 VAF ar II tipa kļūdu $\leq 0,05$ un ka moduļa Somatic Variant Module izmantotā 0,026 VAF robežvērtība (faktiskā LoB) atbalsta I tipa kļūdu $\leq 0,01$. Pamatojoties uz šiem apgalvojumiem, tiek prognozēts, ka variants pie 0,05 VAF ir lielāks par vai vienāds ar 0,026 VAF 95% gadījumu un ka savvaļas tipa pozīcija ir mazāka par 0,026 VAF 99% gadījumu. Lai pārliecinātos, ka šie apgalvojumi tika izpildīti ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), mērījumi tika atkārtoti NextSeq 550Dx instrumentā ar savvaļas tipu paraugiem (LoB paraugiem) un ar paraugiem, kuros bija varianti pie 0,05 VAF (LoD paraugiem), izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Pēc tam to noteikšanas gadījumu proporcija, kuri bija virs un zem 0,026 robežvērtības, tika salīdzināti ar apgalvojumiem, kas bija noteikti ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

Testēšana ietvēra divus LoD paraugus, katru ar unikālu variantu kopu, mērķētu uz 0,05 VAF, un atbilstošus LoB paraugus, kas mērķa variantiem bija savvaļas tips. Bibliotēkas sagatavošanai LoD un LoB paraugi tika apstrādāti attiecīgi astoņos un septiņos replikātos, izmantojot ampliconu komplektu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Sākotnēji bibliotēkas tika sekvencētas, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli), lai identificētu variantus/genoma koordinātes LoB/LoD novērtēšanai ar reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Visi varianti, kuru vidējā VAF bija 0,045–0,055 (LoD varianti), pamatojoties uz rezultātiem no reaģentu komplekta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli), tika izmantoti LoD analīzei (N = 51 variants). LoB analīzei tika novērtētas 51 atbilstošā genoma koordinātes.

Lai novērtētu reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), bibliotēkas tika sekvencētas trīs izpildēs trīs dienas pēc kārtas, izmantojot to pašu instrumentu un reaģentu komplekta partiju. Šajā testēšanā tika izmantoti 24 replikāti katram no 51 LoD varianta un 21 replikāts katrai no atbilstošajām savvaļas tipa pozīcijām. Proporcija, kādu veidoja savvaļas tipa noteikšanas gadījumi, kuru VAF $< 0,026$, ir parādīta [29. tabula](#). Proporcija, kādu veidoja LoD variantu noteikšanas gadījumi, kuru VAF bija lielāks par vai vienāds ar 0,026, ir parādīta [30. tabula](#).

29. tabula Proporcija tiem noteikšanas gadījumiem, kur ir $< 0,026$ savvaļas tipu pozīcijām (LoB apgalvojumu novērtējums)

Varianta tips	Novērtētās pozīcijas	Kopējie novērojumi	VAF mērījumu skaits $\geq 2,6\%$	Proporcija $< 2,6\%$	Proporcija 95% Ticamības intervāls
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Insercija	11	231	0	1	0,984–1
Delēcija	8	168	0	1	0,978–1

30. tabula Proporcija tiem noteikšanas gadījumiem, kur ir $\geq 0,026$ VAF LoD variantiem (LoD apgalvojumu novērtējums)

Varianta tips	Novērtētās pozīcijas	Kopējie novērojumi	VAF mērījumu skaits < 2,6%	VAF mērījumu skaits $\geq 2,6\%$	Proporcija $\geq 2,6\%$	Proporcija 95% Ticamības intervāls
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Insercija	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Delēcija	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Precizitāte

Germline

Tālāk aprakstītais pētījums tika veikts, lai novērtētu variantu noteikšanas akurātumu ar Germline Variant Module, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Divpadsmit unikāli Platinum Genome paraugi tika testēti, izmantojot reprezentatīvu analīzi. Kopā tika veiktas 11 izpildes, izmantojot trīs NextSeq 550Dx instrumentus un trīs NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) partijas.

Akurātums attiecībā uz SNV, insercijām un delēcijām tika noteikts, rezultātus salīdzinot ar labi izpētītu kompozītu standartmetodi, Platinum Genomes versiju 2016-1.0. Atsaucei ir doti akurātuma rezultāti no vienas sekvencēšanas izpildes, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Rezultātu kopsavilkums ir sniegts 31. tabula.

31. tabula Germline sakrītības kopsavilkums

Kritēriji	Kopējie novērojumi (v2.5) ¹	Novērotais rezultāts (v2.5) ²	Novērotais rezultāts (v2) ³	Izpildes rezultāts (v2.5) ⁴	Izpildes rezultāts (v2) ⁴
PPA attiecībā uz SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA insercijām	1056	100	100	100	98,9
PPA delēcijām	1056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Aprēķināts kā paraugu skaits vienā izpildē x izpildžu skaits (96 paraugi vienā izpildē x 11 izpildes = 1056 novērojumi).

²Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta visās izpildēs (pamatoties uz 11 izpildēm reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta 1 izpildē (kopā 96 novērojumi).

⁴ Viszemākā vērtība, kad dati no katras izpildes tiek analizēti apkopotā veidā.

Somatic

Tālāk aprakstītais pētījums tika veikts, lai novērtētu Somatic Variant Module variantu noteikšanas akurātumu NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli). Izmantojot reprezentatīvu analīzi, tika testēti desmit Platinum Genome FFPE paraugi (diviem paraugiem varianti bija atšķaidīti līdz 0,05 VAF). Kopā tika veiktas 11 izpildes, izmantojot trīs NextSeq 550Dx instrumentus un trīs NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) partijas.

Akurātums attiecībā uz SNV, insercijām un delēcijām tika noteikts, rezultātus salīdzinot ar labi izpētītu kompozītu standartmetodi, Platinum Genomes versiju 2016-1.0. Atsaucei ir doti akurātuma rezultāti no vienas sekvencēšanas izpildes, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Rezultātu kopsavilkums ir sniegts 32. tabula.

32. tabula Somatic sakrītības kopsavilkums

Kritēriji	Kopējie novērojumi (v2.5) ¹	Novērotais rezultāts (v2.5) ²	Novērotais rezultāts (v2) ³	Izpildes rezultāts (v2.5) ⁴	Izpildes rezultāts (v2) ⁴
PPA attiecībā uz SNV	528	100	100	100	100
PPA insercijām	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA delēcijām	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

¹Aprēķināts kā paraugu skaits vienā izpildē x izpilžu skaits (48 paraugi vienā izpildē x 11 izpildes = 528 novērojumi).

²Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta visās izpildēs (pamatojoties uz 11 izpildēm reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Viszemākā novērotā vērtība pēc parauga replikāta 1 izpildē (kopā 96 novērojumi).

⁴Viszemākā vērtība, kad dati no katras izpildes tiek analizēti apkopotā veidā.

Precizitāte

Germline

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) precizitāte ar Germline Variant Module tika novērtēta, izmantojot Platinum Genome paraugus un reprezentatīvu analīzi. Testēšana sastāvēja no vienas bibliotēkas sagatavošanas, izmantojot TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, un tajā bija 12 paraugi, katrs apstrādāts ar astoņiem replikātiem. Bibliotēkas tika sekvecētas ar trīs NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) partijām un trīs NextSeq 550Dx instrumentiem, kopā veicot deviņas sekvecēšanas izpildes.

Tika izmantoti paraugi ar heterozigotiskiem variantiem, lai noteiktu, vai analīzei piemītošais mainīgums ietekmē genotipa noteikšanu (N = 153 unikāli heterozigotiski varianti). Cx vērtība tika noteikta abām Germline Variant Module robežvērtībām (0,2 heterozigotiskiem un 0,7 homozigotiskiem genotipiem), kur x ir robežvērtību pārsniedzšo atkārtoto testu proporcija. Zemākajai robežvērtībai 0,2 VAF variants ar minimālo Cx reaģentu komplektam NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cikli) bija > 99,9%, norādot, ka > 99,9% heterozigotisko variantu tiku noteikti kā heterozigotiski. Augstākajai robežvērtībai 0,7 VAF variants ar maksimālo Cx reaģentu komplektam NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cikli) bija < 1,5%, norādot, ka ≤ 1,5% heterozigotisko variantu tiku noteikti kā homozigotiski. 33. tabula ir rezultātu kopsavilkums pēc varianta tipa. Atsaucei ir dotas Cx vērtības no vienas sekvecēšanas izpildes, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

33. tabula Germline Cx vērtības heterozigotiskiem variantiem

Varianta tips	N	Robežvērtība pie 0,2 VAF		Robežvērtība pie 0,7 VAF	
		Min. Cx (v2.5) ¹	Min. Cx (v2) ²	Maks. Cx (v2.5) ¹	Maks. Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9%	> 99,9%	1,5%	1,0%
Insercijas	24	100%	100%	0%	< 0,1%
Delēcijas	35	100%	> 99,9%	< 0,1%	< 0,1%

¹Cx vērtības, pamatojoties uz kopējās standartnovirzes prognozēm no dispersijas komponenta analīzes.

²Cx vērtības, pamatojoties uz paraugu standartnovirzēm.

Somatic

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) precizitāte ar Somatic Variant Module tika novērtēta, izmantojot Platinum Genome FFPE paraugus un reprezentatīvu analīzi. Testēšana sastāvēja no vienas bibliotēkas sagatavošanas, izmantojot TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, un tajā bija divi paraugi, katrs ar astoņiem replikātiem. Bibliotēkas tika sekvenčētas, izmantojot trīs NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) partijas un trīs NextSeq 550Dx instrumentus, kopā veicot deviņas sekvenčēšanas izpildes.

Lai novērtētu instrumenta mainīgumu pie Somatic Variant Module VAF robežvērtības (somatiskie varianti, kuru VAF līmenis ir $\geq 0,026$, variantam tiek noteikti kā pozitīvi), tika izmantoti somatiskie varianti, kuriem gaidāmie VAF līmeņi bija $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unikāls variants). C95 vērtības tika noteiktas katram no somatiskajiem variantiem. C95 vērtības atspoguļo VAF, pie kuras iespējamība pārsniegt Somatic Variant Module VAF robežvērtību ir 95%. Augstākās C95 vērtības pēc varianta tipa ir ziņotas 34. tabulā. Atsaucei ir doti C95 rezultāti no vienas sekvenčēšanas izpildes, izmantojot reaģentu komplektu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli).

34. tabula Somatic C95 kopsavilkums

Varianta tips	Novērtēto variantu skaits	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insercijas	24	0,062	0,061
Delēcijas	33	0,060	0,060

¹C95 vērtības, pamatojoties uz kopējās standartnovirzes prognozēm no dispersijas komponenta analīzes.

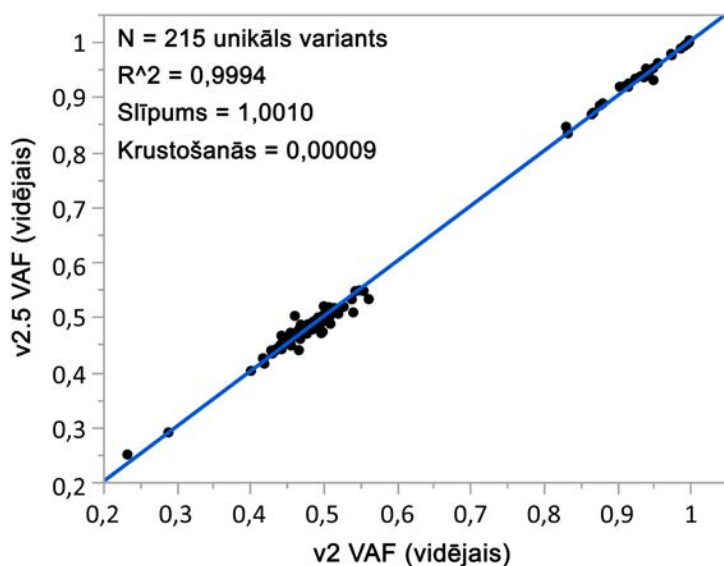
²C95 vērtības, pamatojoties uz paraugu standartnovirzēm.

Metožu salīdzinājums (reaģentu komplekts)

Germline

Vidējās VAF vērtības no 215 unikāliem variantiem tika novērtētas reaģentu komplektā NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) un reaģentu komplektā NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), izmantojot no Germline Variant Module ģenerētos rezultātus. VAF vidējās vērtības tika aprēķinātas no 11 sekvenčēšanas izpildēm (v2.5) un vienas sekvenčēšanas izpildes (v2). Katra varianta vidējās vērtības aprēķināšanai tika izmantoti vismaz astoņi replikāti. 3. attēls ir redzama VAF korelācija starp abiem reaģentu komplektiem. Pamatojoties uz šo abu reaģentu komplektu izteikto lineāro VAF korelāciju un rezultātu līdzību, veiktspējas raksturlielumi, kas sākotnēji bija verificēti un validēti reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) ar Germline Variant Module, tiek uzskatīti par piemērojamiem reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli).

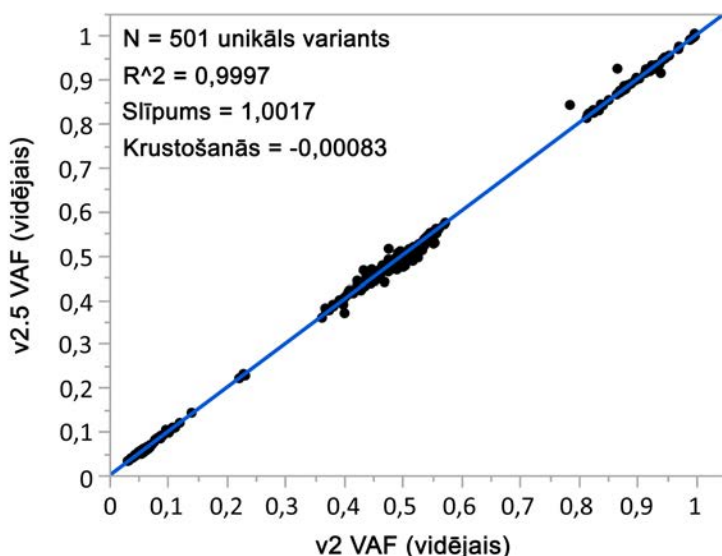
3. attēls Germline Variant Module Variant Allele Frequency (VAF) korelācija starp NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) un NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli).



Somatic

Vidējās VAF vērtības 501 unikālam variantam tika novērtētas reaģentu komplektā NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) un reaģentu komplektā NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli), izmantojot no Somatic Variant Module ģenerētos rezultātus. VAF vidējās vērtības tika aprēķinātas no 11 sekvenčēšanas izpildēm (v2.5) un vienas sekvenčēšanas izpildes (v2). Katra unikālā varianta vidējās vērtības aprēķināšanai tika izmantoti vismaz trīs replikāti. 4. attēls ir redzama VAF korelācija starp abiem reaģentu komplektiem. Pamatojoties uz reaģentu komplektu VAF korelāciju un rezultātu līdzību, veikspējas raksturlielumi, kas bija verificēti un validēti reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) ar Somatic Variant Module, tiek uzskatīti par piemērojamiem reaģentu komplektam NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli).

4. attēls Somatic Variant Module Variant Allele Frequency (VAF) korelācija starp NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cikli) un NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli).



Pārskatījumu vēsture

Dokuments	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokumenta Nr. 1000000030326 v06	2022. gada maijs	Atjauninājumi, kas veikti, lai labotu saturu, kas nejausi pievienots no avota programmatūras.
Dokumenta Nr. 1000000030326 v05	2021. gada novembris	Iekļauts paziņojums par brīdinājumiem un piesardzības pasākumiem saistībā ar ziņošanu par nopietniem incidentiem. Procedūras principu sadaļā pievienots paziņojums, kas precīzē paredzēto lietotāju. Izņemta atsauce uz High Output Reagent Kit v2 (300 cikli). Pievienota atsauce uz High Output Reagent Kit v2.5 (75 cikli).
Dokumenta Nr. 1000000030326 v04	2021. gada augusts	Pievienota pārskatījumu vēstures tabula. Atjaunināta ES pilnvarotā pārstāvja adrese.

Patenti un preču zīmes

Šī dokumenta un tā satura īpašumtiesības pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto izstrādājumu lietošanu, un nekādiem citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publicēt, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās puses tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī izstrādājuma(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2022 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo īpašnieku īpašums. Konkrētu informāciju par preču zīmēm skatiet tīmekļa vietnē:
www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformācija



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, ASV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Austrālijas sponsors

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

Produktu marķēšana

Pilnīgu atsauci uz simboliem, kas var parādīties uz produkta iepakojuma un marķējuma, skatiet simbolu sarakstā vietnē: support.illumina.com.