

# Seade NextSeq™ 550Dx

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS  
AINULT EKSPORDIKS

Katalooginumber 20005715

## Sihtotstarve

Seade NextSeq 550Dx on ette nähtud kasutamiseks DNA teekide sekveneerimiseks kasutamisel koos *in vitro* diagnostiliste analüüsidega. Seadet NextSeq 550Dx tuleb kasutada spetsiifiliste registreeritud, serditud või heaks kiidetud *in vitro* diagnostikareaktiivide ja analüüsitarkvaraga.

## Tööpõhimõtted

Seade Illumina NextSeq 550Dx on ette nähtud kasutamiseks DNA teekide sekveneerimiseks *in vitro* diagnostiliste analüüsidega. Seade NextSeq 550Dx kasutab sisendina teeke, mis on loodud DNA-st, mille puhul proovide indeksid ja kinnistusjärjestused lisatakse amplifitseeritud sihtmärkidele. Proovide teegid kinnistatakse läbivooluküvetile ja sekveneeritakse seadmes sünteesi teel sekveneerimise (SBS) meetodiga. SBS-meetod kasutab pöörduvat terminaatorit, et tuvastada fluorestsentsmärgistusega üksiknukleotiidi alused nende inkorporeerimisel kasvavatesse DNA-ahelatesse. Reaalajas analüüsi (RTA) tarkvara analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekveneerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Kui esmane analüüs lõppeb, saab seadmel käivitada sekundaarse analüüsi aluse nimetuste töötlemiseks. NextSeq 550Dx kasutab töövoost olenevalt erinevaid sekundaarse analüüsi mooduleid. Idutee või somaatilise variandi moodulis sisaldab töötlemine demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joendamist, variandi nimetamist ja variandi nimetuste vormingufailide (VCF ja gVCF) loomist. VCF- ja gVCF-failid sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel.

## Topeltkäivituse konfiguratsioon

NextSeq 550Dx sisaldab topeltkäivituse konfiguratsiooni, mis võimaldab kasutada seadet kas diagnostikarežiimis (Dx) või kasutamiseks ainult teadusuuringute (RUO) režiimis. *In vitro* diagnostika sekveneerimisanalüüsid, sh idutee ja somaatilise variandi moodulid, tehakse diagnostikarežiimis. Diagnostikarežiimis saab kasutada ainult IVD sekveneerimise reaktiive. Seadme NextSeq 550Dx toimivusnäitajad ja protseduuri piirangud on määratud, kasutades idutee ja somaatilise variandi mooduleid diagnostikarežiimis.

## Piirangud

- 1 *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks
- 2 Kasutamisel seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) või seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli), saab idutee ja somaatilise variandi moodulitega edastada järgmist:
  - ▶ sekveneerimisväljundit  $\geq 90$  gigabaasi (Gb)
  - ▶ lugemi pikkust (paaritudemuse käituses)  $2 \times 150$  aluspaari (bp)
  - ▶ aluseid, mille väärtus on  $Q30 \geq 75\%$  või sellest suurem lugemi pikkusel  $2 \times 150$  bp  
Alustel väärtusega 75% või suurema väärtusega on Phredi skaala kvaliteediskoorid  $\geq 30$ , mis näitavad aluse nimetuse täpsust, mis on suurem kui 99,9%
- 3 Analüüsitarkvara ei joonda indelitega (insertioonid, deletsioonid või kombinatsioonid) lugemeid, mille sisu pikkus on  $> 25$  bp. Sellest tulenevalt ei tuvasta analüüsitarkvara indeleid, mille pikkus on  $> 25$  bp.

- 4 Analüüsitarvara ei pruugi joondada äärmusliku variantse sisuga amplikoni lugemeid, mistõttu märgitakse piirkond aruandes metsiktüübiks. Äärmuslik sisu tähendab järgmist.
  - ▶ Lugemid, milles on rohkem kui kolm indelit
  - ▶ Vähemalt 30 bp pikkusega lugemid, mille üksiknukleotiidsete variantide (SNV) sisaldus on > 4% amplikoni sihtmärgi kogupikkusest (v.a sondi piirkonnad)
  - ▶ Lugemid pikkusega < 30 bp, kusjuures SNV sisaldus on > 10% amplikoni kogupikkusest (kaasa arvatud sondipiirkonnad)
- 5 Suuri variante, sealhulgas mitmenukleotiidseid variante (MNV-d) ja suuri indeleid, võidakse VCF-väljundfailis märkida eraldi väiksemate variantidena.
- 6 Deletsioonivariante võidakse filtreerida või vahele jätta, kui ulatus on kaks paanitud amplikoni ja deletsiooni pikkus on suurem või võrdne paanitud amplikonide kattuva osaga.
- 7 Süsteem ei saa tuvastada indeleid, kui need esinevad vahetult praimeril kõrval ja pole kattuvat amplikoni. Analüüs ei saa tuvastada deletsioone kattuvate amplikonidega piirkondade puhul, kui deletsioon on väiksem kui tuvastatava deletsiooni suurus. Näiteks kui kahe kõrvuti asetseva amplikoni kattuvuspiirkond on kaks alust, siis ei saa analüüs tuvastada deletsioone, mis hõlmavad mõlemat alust. Mõlemas aluses on võimalik tuvastada ühe aluse deletsiooni.
- 8 Nagu iga hübriidsatsioonipõhise teegi ettevalmistuse puhul, võivad oligonukleotiidi siduvates piirkondades esinevad polümorfismid, mutatsioonid, insertioonid ja deletsioonid mõjutada uuritavaid allelele ja sekveneerimise ajal tehtavaid nimetamisi. Näited.
  - ▶ Varianti, mis on faasis praimeril piirkonnas oleva variandiga, ei pruugita amplifitseerida, mille tulemuseks on valenegatiiv.
  - ▶ Praimeril piirkonnas olevad variandid võivad takistada referentsalleeli amplifitseerimist, mille tulemuseks on vale homosügootse variandi nimetus.
  - ▶ Praimeril piirkonnas olevad indelivariandid võivad lugemi lõpus praimeril kõrval põhjustada valepositiivse nimetuse.
- 9 Indeleid võidakse filtreerida ahela nihke tõttu, kui indelid esinevad ühe lugemi lõpu lähedal ja on joondamise ajal pehmelõigatud (soft-clipped).
- 10 Väikeseid MNV-sid pole valideeritud ja märgitakse ainult moodulis Somatic Variant.
- 11 Deletsioone märgitakse VCF-is eelmise aluse koordinaadis VCF-vormingu kohaselt. Seega kaaluge läheduses olevaid variante, enne kui märgite, et konkreetse aluse nimetus on homosügootne referents.
- 12 Mooduli Germline piirangud
  - ▶ Seade NextSeq 550Dx, mis kasutab seadmele NextSeq 550Dx mõeldud tarkvara Local Run Manager moodulit Germline Variant, on ette nähtud esitama idutee variantide nimetamise (nt homosügootne, heterosügootne, metsiktüüpi) kvalitatiivseid tulemusi.
  - ▶ Kui seda kasutatakse mooduliga Germline Variant, on variantide täpse nimetamise jaoks vajalik amplikoni katvus, mis on vähemalt 150x. Sellest tulenevalt on vaja 150 toetatavat DNA-fragmenti, mis on võrdne 300 kattuva paarisotsalise lugemiga. Katvust mõjutavad proovide arv ja sihtaluste koguarv. Katvust võivad mõjutada GC sisaldus ja muu genomne sisu.
  - ▶ Koopiaarvu variatsioon võib mõjutada seda, kas variant tuvastatakse homosügoodi või heterosügoodina.
  - ▶ Teatud korduvas kontekstis filtreeritakse VCF-failides variandid välja. Korduse filtrit RMxN kasutatakse variantide filtreerimiseks, kui variandijärjestus või selle osa esineb referentsgenoomis variandi asukoha juures korduvalt. Idutee variantide nimetamise puhul on referentsis variandi filtreerimiseks vaja vähemalt üheksa kordust. Arvesse võetakse ainult kordusi, mille pikkus on kuni 5 bp (R5x9).
  - ▶ Ühes lookuses oleva indeli ja SNV puhul märgitakse aruandes ainult üks variant.
- 13 Somaatilise mooduli piirangud
  - ▶ Seade NextSeq 550Dx, mis kasutab seadmele NextSeq 550Dx mõeldud tarkvara Local Run Manager moodulit Somatic Variant, on ette nähtud esitama somaatiliste variantide nimetamise kvalitatiivseid tulemusi (nt somaatilise variandi olemasolu variandi sagedusega suurem kui või võrdne väärtusega

0,026 ja avastamispiiriga 0,05).

- ▶ Kui seda kasutatakse mooduliga Somatic Variant, on variantide täpse nimetamise jaoks vajalik amplikoni katvus, mis on vähemalt 450x oligonukleotiidide kogumi kohta. Sellest tulenevalt on vaja 450 toetavat DNA-fragmenti iga oligonukleotiidide kogumi kohta, mis on võrdne 900 kattuva paarisotsalise lugemiga. Katvust mõjutavad proovide arv ja sihtaluste koguarv. Katvust võivad mõjutada GC sisaldus ja muu genoomne sisu.
- ▶ Somaatiliste variantide nimetamise puhul on referentsis variandi filtreerimiseks vaja vähemalt kuus kordust ja arvesse võetakse ainult kordusi, mille pikkus on kuni 3 bp (R3x6).
- ▶ Moodul Somatic Variant ei suuda eristada idutee variante ja somaatilisi variante. Moodul on mõeldud variantide tuvastamiseks eri variantide sageduste seast, kuid variandi sagedust ei saa kasutada idutee variandi ja somaatilise variandi eristamiseks.
- ▶ Proovis sisalduv normaalne kude mõjutab variantide tuvastamist. Kirjeldatud avastamispiir põhineb variandi sagedusel võrreldes kogu DNA-ga, mis on võetud nii kasvajasst ja normaalsest koest.

## Toote komponendid

- 1 Seade NextSeq 550Dx, katalooginumber 20005715.
- 2 Seadme NextSeq 550Dx tarkvarakomponendid, sh järgmine.

| Tarkvararakendus                        | Funktsioon                | Kirjeldus  |
|---|---------------------------|--|
| Operatsioonisüsteem NextSeq 550Dx (NOS) | Juhib seadme tööd         | NOS-i tarkvararakendus juhib seadme tööd sekveneerimise ajal ja loob kujutised, mida saab kasutada reaaliajase analüüsi (Real-Time Analysis, RTA) tarkvaras.   |
| Reaaliajase analüüsi tarkvara (RTA)     | Teeb esmase analüüsi      | RTA tarkvararakendus teisendab NOS-i loodud kujutised sekveneerimiskäituse tsükli iga paani jaoks aluse nimetuse failidesse, mis on sisendid Local Run Manageri analüüsimoodulite jaoks. RTA tarkvararakendus ei sisalda kasutajaliidest.  |
| Tarkvara Local Run Manager              | Moodulivaliku liides      | Tarkvara Local Run Manager on seadmesse integreeritud lahendus kasutajahalduseks, sobiva analüüsimooduli valimiseks ja oleku jälgimiseks.  |
| Somaatilise variandi moodul             | Teeb sekundaarse analüüsi | See Local Run Manageri analüüsimooduli tarkvara töötleb aluse nimetusi sekundaarse analüüsiga. Analüüsimine hõlmab demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joendamist, variandi nimetamist ja aruandlust. Variandi nimetaja (Pisces) loob VCF-failid, mis sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel, ja sisaldab mõõdetud variandi sagedust.                     |
| Idutee variandi moodul                  | Teeb sekundaarse analüüsi | See Local Run Manageri analüüsimooduli tarkvara töötleb aluse nimetusi sekundaarse analüüsiga. Analüüsimine hõlmab demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joendamist, variandi nimetamist ja aruandlust. Variandi nimetaja (Pisces) loob VCF-failid, mis sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel, ja tuvastab iga variandi heterosügootse või homosügootsena. |

## Töötingimused

| Mõjur       | Spetsifikatsioon   |
|-------------|--|
| Temperatuur | Hoidke labori temperatuuri vahemikus 19 °C kuni 25 °C (22 °C ± 3 °C). See temperatuur on seadme töötemperatuur. Tööttsükli ajal püüdke hoida püsivat ruumitemperatuuri, mis ei muutuks rohkem kui ±2 °C. |
| Õhuniiskus  | Hoidke suhtelist õhuniiskust vahemikus 20–80% (mittekondenseeruv).   |

## Seadmed ja materjalid

### Vajalikud seadmed ja materjalid, müügil eraldi

Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2 (300 tsükli), katalooginumber 20019554

Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2.5 (300 tsükli), katalooginumber 20028871

### Vajalikud seadmed ja materjalid, pole kaasas

#### Sekvenerimiskäituse kulutarvikud, mille hangib kasutaja

| Kulutarvik  | Tarnija   | Otstarve                                       |
|---|---|--|
| Alkoholiga puhastuslapid, 70% isopropüül või etanool, 70% | VWR, kataloogi nr 95041-714 (või sarnane toode)<br>Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt | Läbivooluküveti puhastamiseks ja üldotstarbeks |
| Laborisalvrätid, vähe kiude sisaldavad                    | VWR, kataloogi nr 21905-026 (või sarnane toode)   | Läbivooluküveti puhastamiseks ja üldotstarbeks |

#### Seadme hoolduse kulutarvikud, mille hangib kasutaja

| Kulutarvik                     | Tarnija  | Otstarve  |
|--------------------------------|--|---|
| NaOCl, 5% (naatriumhüpoklorit) | Sigma-Aldrich, katalooginr 239305 (või laborikvaliteediga sarnane toode) | Seadme pesemine käsitsi käitusejärgselt; lahjendatud 0,12%-ni |
| Tween 20                       | Sigma-Aldrich, katalooginr P7949   | Seadme pesemine käsitsi; lahjendatud 0,05%-ni                 |
| Vesi, laborikvaliteediga       | Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt                                     | Seadme pesemine (käsitsi pesemine)                            |
| Õhufilter                      | Illumina, katalooginr 20022240   | Õhu puhastamine, mida seade jahutamiseks võtab                |

#### Juhised laborivee jaoks

Seadmega töötamiseks kasutage alati laborikvaliteediga või deioniseeritud vett. Ärge kasutage kraanivett. Kasutage ainult järgmise kvaliteediga vett või selle ekvivalente.

- ▶ Deioniseeritud vesi
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18-megaoomine (MΩ) vesi
- ▶ Milli-Q vesi
- ▶ Super-Q vesi
- ▶ Molekulaarbioloogias kasutatava puhtusastmega vesi

#### Hoiatused ja ettevaatusabinõud



##### HOIATUS!

USA föderaalseaduse kohaselt võib seda seadet müüa või kasutada ainult arst (või arsti korraldusel) või muu meditsiinitöötaja, kellele on oma tegevuskoha osariigi seaduse järgi väljastatud kutsetunnistus (või tema korraldusel).

- 1 **Mõni seadmega NextSeq 550Dx kasutatav Illumina pakutav reaktiivi komponent sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi.**

**Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja kõrvaldage need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel.** Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalist lisateavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 2 Käsitsege kõiki vereproove inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV), inimese B-hepatiidi viiruse (HBV) või muude verega edasikanduvate patogeene suhtes nakkusohulina (universaalsed ettevaatusabinõud).
- 3 Esitatud juhiste eiramine võib viia valetulemusteni või märkimisväärselt vähendada proovide kvaliteeti.
- 4 Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökeskkonnas. Proovide ja komplekti reaktiivide käsitsemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja komplekti reaktiivide käsitsemist peske käed põhjalikult puhtaks.
- 5 Korraldage laboritavad ja hea laborisisene hügieen on vajalikud, et vältida reaktiivide, seadmete ja genoomsete DNA-proovide saastumist PCR-i produktiga. PCR-i produktiga saastumine võib põhjustada ebatäpseid ja ebausaldusväärseid tulemusi.
- 6 Saastumise vältimiseks tagage, et amplifitseerimisel ja -järgsetes piirkondades oleks olemas vajalik varustus ja vajalikud kulutarvikud (nt pipetid, pipeti otsakud, kütteplokid, segistid ja tsentrifuugid).
- 7 Proovide paarimise indeks peab vastama täpselt trükitud plaadi kujundusele. Local Run Manager täidab automaatselt proovi nimedega seotud indeksi praimeerid, kui need moodulisse sisestatakse. Kasutajal soovitatakse kinnitada prooviga seotud indeksi praimeerid enne sekveneerimiskäituse alustamist. Proovi ja plaadi kujunduse mittevastavus põhjustab positiivse proovi puudulikkust identifitseerimisel ja tulemuste valesti esitamisel.
- 8 Arvuti kaitsmiseks viiruste eest on tungivalt soovitatav kasutada viirustõrjetarkvara, mille hangib kasutaja. Paigaldamise juhiseid vaadake kasutusjuhendist.
- 9 Ärge kasutage seadet NextSeq 550Dx, kui üks paneelidest on eemaldatud. Seadme kasutamine eemaldatud paneelidega põhjustab kokkupuuteohtu liinipingele ja alalisvoolupingele.
- 10 Ärge puudutage läbivooluküveti kambri läbivooluküveti alust. Selle kambri kütteseadet töötab temperatuuril vahemikus 22 °C kuni 95 °C ja võib põhjustada põletusi.
- 11 Seade kaalub umbes 84 kg (185 naela) ja mahapillamisel või valekasutuse korral võib see tekitada raskeid vigastusi.

## Kasutusjuhised

Järgmised kasutusjuhised on ette nähtud iduttee ja somaatilise variandi moodulite kasutamiseks seadme NextSeq 550Dx diagnostikarežiimis, kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) või seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli).

## Käituse teabe sisestamine

Üksiasjalikke juhiseid vaadake seadme NextSeq 550Dx viitejuhendist (dokument nr 100000009513) ja vastava Local Run Manageri mooduli juhendist.

### Määra parameetrid

- 1 Logige sisse rakendusse Local Run Manager.
- 2 Valige suvand **Create Run** (Loo käitus) ja seejärel suvand **Somatic Variant** (Somaatiline variant) või **Germline Variant** (Iduttee variant).
- 3 Sisestage käituse nimi, mis identifitseerib käituse sekveneerimisest analüüsini. Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.
- 4 **[Valikuline]** Sisestage käituse kirjeldus, et aidata käitust identifitseerida. Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.
- 5 Valige rippmenüüst proovide arv ja indeksikomplekt. Mõelge valiku tegemisel järgmisele teabele.

- ▶ Rippmenüü sisaldab proovide arvu, millel on indeksikomplekt. Näiteks 24-komplekt 1 tähistab 24 testitavat proovi koos indeksikomplekti 1 indeksitega.
- ▶ Indeksikomplekti numbrid viitavad erinevatele i5 ja i7 indeksipaaride komplektidele. Komplekt 1 ja komplekt 2 pakuvad indeksite mitmekesisust. Pakutakse kahte indeksikomplekti, mis aitavad vältida ühe komplekti ammendumist.
- ▶ Valige proovide arv, mis on lähim testitavate proovide arvule. Kui loendis täpset proovide arvu pole, valige testimiseks vajalikule lähim, kuid proovide arvust väiksem arv. Näiteks kui soovite testida 18 proovi, valige 16 proovi.
- ▶ Indeksit mitmekesisuse nõuetele vastavad soovitatud proovide kaevud ja indeksikombinatsioonid on esile tõstetud rohelisega.

#### Manifestifailide importimine käituse jaoks

- 1 Veenduge, et imporditavad manifestid oleksid kättesaadavad juurdepääsetavas võrgus või USB -draivil.
- 2 Valige käsk **Import manifests** (Impordi manifestid).
- 3 Liikuge manifestifaili juurde ja valige manifestid, mille soovite lisada.



#### MÄRKUS.

Manifestifailide kättesaadavaks tegemiseks kõigi käituste jaoks, kasutades idutee variandi või somaatilise variandi analüüsimoodulit, lisage manifestid funktsiooni Module Settings (Mooduli sätted) abil. See funktsioon nõuab administraatori taseme õigusi. Lisateavet vt *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhendist (dokument nr 100000009513)*.

#### Proovide määramine käituse jaoks


Määrake käituse proovid, kasutades ühte järgmistest valikutest ja juhistest.

- ▶ **Proovide sisestamine käsitsi** – kasutage tühja tabelit kuval Create Run (Käituse loomine).
- ▶ **Proovide importimine** – liikuge komaeraldusega väärtuste (\*.csv) vormingus välise faili juurde. Malli saab alla laadida kuvalt Create Run (Käituse loomine).

#### Proovide sisestamine käsitsi

- 1 Sisestage kordumatu proovi nimi (**somaatilise variandi analüüsimoodul**) või proovi ID (**idutee variandi analüüsimoodul**).  
Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
- 2 **[Valikuline]** Positiivsete või negatiivsete kontrollproovide jaoks paremklõpsake ja valige kontrollitüüp. Ühes proovikaevus sisalduv kontroll täidab teise kogumi vastava kaevu sama kontrolliga.
- 3 **[Valikuline]** Sisestage väljale Sample Description (Proovi kirjeldus) proovi kirjeldus.  
Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
- 4 Valige indeksi 1 adapter rippmenüüst Indeks 1 (i7).  
Soovitatud proovide kaevude kasutamisel täidab tarkvara i7 ja i5 indeksiaadapterid, mis vastavad indeksi mitmekesisuse nõuetele. Kui loendis pole täpset testitavate proovide arvu, valige lisakaevude jaoks kindlasti indeksiaadapterid.
- 5 Valige indeksi 2 adapter rippmenüüst Indeks 2 (i5).
- 6 Valige rippmenüüst Manifest manifestifail.  
A-kogumi proovid nõuavad teistsugust manifesti kui proovid B-kogumist.
- 7 Valige suvand plaadi kujunduse vaatamiseks, printimiseks või salvestamiseks viitena teekide ettevalmistamisel:
  - Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon **Print** (Prindi). Plaadikujunduse printimiseks valige käsk **Print** (Prindi).
  - Valige käsk **Export** (Ekspordi), et eksportida proovi teave välisesse faili.
- 8 Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

### Proovide importimine

- 1 Valige käsk **Import Samples** (Impordi proovid) ja sirvige proovi teabefaili asukohta. Imporditavaid faile on kahte tüüpi.
  - Uue plaadikujunduse tegemiseks valige suvand **Template (Mall)** kuval Create Run (Käituse loomine). Mallifail sisaldab impordiks õigeid veerupäiseid. Sisestage igas veerus käituses olevate proovide kohta proovide teave. Kustutage näidisteave kasutamata lahtritest ja seejärel salvestage fail.
  - Kasutage idutee variandi või somaatilise variandi moodulist ekspordifunktsiooni abil eksporditud proovide teabega faili.
- 2 Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon  **Print** (Prindi).
- 3 Valige käsk **Print** (Prindi), et printida plaadi kujundus teekide ettevalmistamise näidisenä.
- 4 Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

## Reaktiivikasseti ettevalmistamine

Edukaks sekveneerimiseks järgige kindlasti hoolikalt reaktiivikasseti juhiseid.

- 1 Vötke reaktiivikassett  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  kuni  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoiuruumist välja.
- 2 Valige reaktiivide sulatamiseks üks järgmistest meetoditest. Ärge pange kassetti üleni vee alla. Kui kassett on sulatud, kuivatage seda enne minemist järgmisse sammu.

| Temperatuur       | Sulatamise aeg | Stabiilsuspiir          |
|-------------------|----------------|-------------------------|
| 15–30 °C vesivann | 60 minutit     | Mitte kauem kui 6 tundi |
| 2 °C kuni 8 °C    | 7 tundi        | Mitte kauem kui 5 päeva |



### MÄRKUS.

Kui ühes vesivannis sulab korraga rohkem kui üks kassett, sulatage kassette kauem.

- 3 Pöörake kassetti viis korda ümber, et reaktiivid seguneksid.
- 4 Kontrollige kassetti põhja ja veenduge, et reaktiivid oleksid sulanud ja et tekkinud poleks sadet. Veenduge, et positsioonid 29, 30, 31 ja 32 oleksid sulanud, kuna need on kõige suuremad ja nende sulamiseks kulub kõige rohkem aega.
- 5 Õhumullide vähendamiseks koputage õmalt vastu töölauda. Parimate tulemuste saavutamiseks jätkake kohe proovi laadimise ja käituse seadistamisega.

## Läbivooluküveti ettevalmistamine

- 1 Vötke läbivooluküveti karp  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  kuni  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoiuruumist välja.
- 2 Eemaldage karbilt fooliumpakend ja pange 30 minutiks toatemperatuurile seisma.

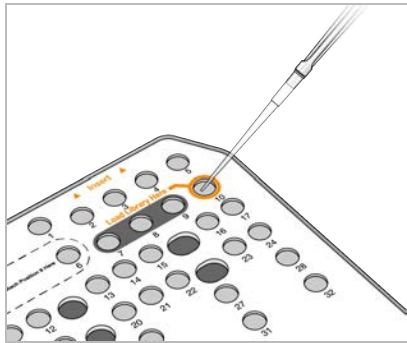
## Teekide ettevalmistamine sekveneerimiseks

Denatureerige ja lahjendage teeke laadimismahuni 1,3 ml. Praktikas võib laadimiskontsentratsioon erineda olenevalt teegi ettevalmistusest ja kvantifitseerimismeetoditest. Prooviteekide lahjendus oleneb oligonukleotiidide kogumite kompleksusest. Juhised prooviteegi ette valmistamiseks sekveneerimiseks, sh teegi lahjendamiseks ja liitmiseks, leiata vastava teegi ettevalmistuskomplekti kasutusjuhendi jaotisest. Vajalik on klasteri tiheduse optimeerimine seadmes NextSeq 550Dx.

## Teekide laadimine reaktiivikassetti

- 1 Puhastage ebemevaba salvärätiga fooliumtihend, mis katab mahutit nr 10 sildiga **Load Library Here** (Laadige teek siia).
- 2 Läbistage tihend puhta 1 ml pipeti otsakuga.
- 3 Laadige 1,3 ml valmistatud teeke mahutisse nr 10 sildiga **Load Library Here** (Laadige teek siia). Teekide laadimisel vältige fooliumtihendi katsumist.

Joonis 1 Teekide laadimine



## Sekvenerimiskäituse seadistamine

- 1 Logige seadmesse NextSeq 550Dx tarkvara Local Run Manager parooliga.
- 2 Valige NOS-i tarkvara avakuval suvand **Sequence** (Sekvents).
- 3 Valige loendist käitus ja valige suvand **Next** (Edasi).  
Käituse seadistusekraanid avanevad järgmises järjekorras: Load Flow Cell (Läbivooluküveti laadimine), Load Buffer Cartridge (Puhvrikasseti laadimine), Load Reagent Cartridge (Reaktiivikasseti laadimine) ja Pre-run Check (Käituseelne kontroll).
- 4 Kui avaneb ekraan Load Flow Cell (Läbivooluküveti laadimine), puhastage ja seejärel laadige läbivooluküvett.
  - ▶ Eemaldage läbivooluküvett fooliumpakendist.
  - ▶ Avage läbipaistev kaanega plastkarp ja võtke läbivooluküvett välja.
  - ▶ Puhastage läbivooluküveti klaaspinda ebemevaba alkoholilapiga. Kuivatage klaas ebemevaba laboripaberiga.
  - ▶ Veenduge, et läbivooluküveti klaaspind oleks puhas. Vajaduse korral puhastage uuesti.
  - ▶ Eemaldage eelmises käituses kasutatud läbivooluküvett.
  - ▶ Joondage läbivooluküvett üle joondustihvtide ja pange läbivooluküvett paika.
- 5 Valige käsk **Load** (Laadi).  
Uks sulgub automaatselt, ekraanil kuvatakse läbivooluküveti ID ja kontrollitakse andureid.
- 6 Kasutatud reaktiivimahutite tühjendamiseks, seadme NextSeq 550Dx puhvrikasseti laadimiseks ja seadme NextSeq 550Dx reaktiivikasseti laadimiseks järgige tarkvara viipasid.  
Kui seadme NextSeq 550Dx puhvri- ja reaktiivikassetid on laaditud, loeb ja jäädvustab tarkvara RFID. Puhvri- ja reaktiivikasseti ID kuvatakse ekraanil ja kontrollitakse andureid.
- 7 Kui automaatne eelkäituse kontroll on lõppenud, valige käsk **Start** (Alusta). (Pole vaja, kui seadistatud on automaatne algus.)
- 8 Kui käitus algab, kuvatakse ekraan Sequencing (Sekvenerimine). Ekraanil kujutatakse pooleliolevat käitust, sh intensiivsusi ja kvaliteediskoore (Q-skoorid).

## Tulemused

Reaalajas analüüs (RTA) on integreeritud tarkvara, mis analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekvenerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Kui esmane analüüs lõppeb, alustab seadmes NextSeq 550Dx valitud moodul Local Run Manager automaatselt sekundaarse analüüsiga. Siin kirjeldatud sekundaarse analüüsi protsessid on mõeldud idutee ja somaatilise variandi moodulite jaoks.

## Demultipleksimine

Demultipleksimine võrdleb iga indeksi lugemi järjestust käituse jaoks määratud indeksite järjestustega. Selles etapis ei arvestata kvaliteediväärtustega.



Indeksite lugemid identifitseeritakse järgmiste sammudega.

- ▶ Proovid nummerdatakse alates 1-st, lähtudes nende järjestusest käituse jaoks.
- ▶ Valimi number 0 on reserveeritud klastritele, mida proovile ei määratud.
- ▶ Klastrid määratakse proovile siis, kui indeksi järjestus vastab täpselt või kui indeksi lugemi kohta on kuni üks mittevastavus.

## FASTQ-failide genereerimine

Pärast demultipleksimist genereerib tarkvara vaheanalüüsi failid FASTQ-vormingus, mis on tekstivorming, mida kasutatakse järjestuste esitamiseks. FASTQ-failid sisaldavad kõikide proovide lugemeid ja seonduvaid kvaliteediskoore. Klastrid, mis ei läbinud filtrit, on välistatud.

FASTQ-fail sisaldab ainult ühe proovi lugemeid ja selle proovi nimi sisaldub FASTQ-faili nimes. Idutee ja ja somaatilise variandi moodulites luuakse ühe oligokogumi ühe proovi kohta kaheksa FASTQ-faili, neli 1. lugemist ja neli 2. lugemist. See esitab tulemused kokku 8 ja 16 FASTQ-failis vastavalt idutee ja somaatilise proovi kohta. FASTQ-failid on joondamise peamine sisend.

## Joondamine

Joondamisetapi ajal joondab Smith-Watermani ribaalgoritm iga proovi klastrid manifestifailis täpsustatud ampliconjärjestuste kohaselt.

Smith-Watermani ribaalgoritm teostab semiglobaalseid järjestuse joondusi, et määrata sarnased piirkonnad kahele järjestusele. Kogu järjestuse võrdlemise asemel võrdleb Smith-Watermani algoritm kõigi võimalike pikkustega segmente.

Iga paaristulemusega lugemist hinnatakse selle joondamise suhtes selle lugemi asjakohaste sondijärjestustega.

- ▶ Lugemist 1 hinnatakse allavoolu lookusekohaste oligode (DLSO) pöördkomplementi suhtes.
- ▶ Lugemist 2 hinnatakse ülesvoolu lookusekohaste oligode (ULSO) suhtes.
- ▶ Kui lugemi algus ühtib sondijärjestusega, milles pole rohkem kui kolm erinevust (mittevastavus või nihked juhtivate indelide tõttu), joondatakse lugemist täispikkus selle järjestuse ampliconi sihtmärgi suhtes.
- ▶ Analüüsikeemiat arvestades DLSO-s ja ULSO-s indeleid ei täheldata.

Joondused filtreeritakse joondamistulemuste põhjal, lähtudes mittevastavuse määrast kas huvipakkuvas piirkonnas või kogu ampliconis, olenevalt ampliconi pikkusest. Filtreeritud joondused kirjutatakse joondusfailidesse joondamata ja neid ei kasutata variantide nimetamisel.

## Variandi nimetamine

Variandi nimetaja Pisces on kavandatud looma SNV ja indeli variandi nimed seadme jaoks ette valmistatud teekidest.

## Aruanded ja täiendavad väljundfailid

Variandi analüüsimooduli protseduuri PDF ja tabeleraldusega (\*.txt) aruanded, kus kuvatakse mõõdikud, nagu sekveneerimissügavus ja variantide arv. Moodulid loovad ka väljundfailid, nagu VCF-i ja genoomi variantide nimetamise vormingus (gVCF) failid variandi nimetamiseks.

## Kvaliteedikontrolli protseduurid

Tarkvara NextSeq 550Dx hindab iga käitust, proovi ja aluse nimetust, võrreldes neid kvaliteedikontrolli mõõdikutega. Positiivseid ja negatiivseid kontrollmaterjale on soovitatav kasutada ka teekide ettevalmistamises ja neid tuleb hinnata. Hinnake kontrollmaterjale järgmiselt.

- **Negatiivne kontrollmaterjal (malli kontrollmaterjal puudub) või muu negatiivne kontrollmaterjal** – peab andma eeldatava tulemuse. Kui negatiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises, indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud või tekkinud on saastumine.

- **Positiivne kontrollproov** – peab andma eeldatava tulemuse. Kui positiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises või indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud.

## Toimivusnäitajad

Seadme NextSeq 550Dx toimivusnäitajad tuvastati idutee ja somaatilise variandi mooduliga seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplektiga Dx ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) ning kinnitati seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli). Uuringud sisaldasid proovi indekseerimist, proovi ülekandumist, DNA sisendit, analüütilist tundlikkust (kriitiline väärtus / avastamispiir), täpsust, kordustäpsust, meetodi võrdlust ja korratavust.

Loodi analüütilised uuringud seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli), et hinnata varem seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) saadud toimivusväiteid. Tulemused näitavad, et reaktiivikomplektide (v2 ja v2.5) toimivus on võrreldav kasutamisel seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplektiga Dx. Eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajaid, nagu eraldamismeetod või segavad ained, vaadake *seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx pakendi teabelehel*.

## Toimivusnäitajatel kasutatud arvutuste definitsioonid

- 1 Positiivse protsendi ühtivus (Positive Percent Agreement, PPA) arvutatakse referentsmeetodiga variantidena klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
  - ▶  $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate variandi lookuste arv}) / (\text{variandi lookuste koguarv})$   
Analüüsi esitatavad variandi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt positiivsed (TP-d). Referentsnimetuste või erineva variandi nimetusena analüüsi poolt esitatavad variandi lookused on valenegatiivsed (VN-id).
- 2 Negatiivse protsendi ühtivus (Negative Percent Agreement, NPA) arvutatakse referentsmeetodiga metsiktüübiks klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
  - ▶  $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate metsiktüüpi lookuste arv}) / (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv})$   
Analüüsi esitatavad metsiktüüpi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt negatiivsed (TN-id). Analüüsi poolt variantidena esitatavad metsiktüüpi lookused on valepositiivsed (VP-d).
- 3 Üldine protsendi ühtivus (Overall Percent Agreement, OPA) arvutatakse lookuste osakaaluna, mida analüüs referentsmeetodi suhtes õigesti esitab.
  - ▶  $((\text{Analüüsi poolt õigesti esitatud variandi lookuste arv}) + (\text{analüüsi poolt õigesti esitatud metsiktüüpi lookuste arv})) / ((\text{variandi lookuste koguarv}) + (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv}))$
- 4 PPA, NPA ja OPA arvutused ei sisalda nimetusi (variant või referentslookus ei vasta ühele või mitmele kvaliteedifiltrile).
- 5 Autosoomne nimetuse määr arvutatakse, jagades lookuse läbipääsufiltrite koguarvu kromosoomide 1–22 jaoks sekveneeritud positsioonide koguarvuga; kromosoomid X ja Y jäetakse arvutusest välja. See mõõdik ei võta arvesse nimetuste ühtivust referentsmeetodiga.

## Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) toimivus

### Proovi indekseerimine

Teegi ettevalmistamise ajal lisatavad proovi indeksi praimerid määravad igale proovi DNA-le kordumatu järjestuse. Need kordumatud järjestused võimaldavad koondada ühte sekveneerimiskäitusesse mitu proovi. Proovi indekseerimist kasutatakse nii idutee kui ka somaatilise töövoo jaoks. Selle uuringu eesmärk oli tuvastada minimaalne (8) ja maksimaalne (96) proovide arv, mida saab töödelda seadmega NextSeq 550Dx ühes sekveneerimiskäituses. Kaheksat kordumatut platinagenoomi proovi analüüsiti 12 eri indeksi praimeri kombinatsiooniga proovi kohta. Idutee variandi moodulit kasutades tehtud nelja sekveneerimiskäituse proovi tulemusi võrreldi platinagenoomide versiooniga 2016-1.0.

Käituste esimeses komplektis analüüsiti 96 kordumatut indekseeritud prooviteeki näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses ahela kohta kõigis 23 inimkromosoomis, et kontrollida analüüsi suutlikkust järjekindlalt moodustada genotüübi nimetusi konkreetse proovi kohta indeksi praimeri eri kombinatsioonides. Käituste teises komplektis sekveneeriti kaheksat kordumatut indekseeritud prooviteeki kahes sekveneerimiskäituses, et kontrollida toetatud indeksite miinimumarvu. 96 indeksiga käitustes oli SNV-de PPA vahemikus 98,7% kuni 100%, insertioonide ja deletsioonide PPA oli 100% ning NPA oli 100% iga 96 indeksi kombinatsiooni korral. 8 indeksiga käitustes olid kõigi kaheksa indeksi kombinatsiooni PPA väärtused 100% (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) ja NPA väärtused 100%.

## Proovi ülekandumine

Seadmega NextSeq 550Dx saab sekveneerida mitut proovi ja kontrollmaterjale ühes sekveneerimiskäituses. Läbi viidi uuring proovi ülekande ulatuse hindamiseks ühes sekveneerimiskäituses (käitusesisene) ja sekveneerimiskäituste vahel (käitustevaheline). Mitmesuguste geenide uurimiseks loodud näitliku analüüsiga analüüsiti kaht platinagenoomi proovi, üks isas- ja üks emasproov, 12 588 aluses (150 amplikoni) 23 eri kromosoomis, sh mõlema soo kromosoomid. Teeke sekveneeriti seadmes NextSeq 550Dx, kasutades idutee variandi moodulit. Isasproovide ülekandumist emasproovidesse täheldati Y-kromosoomi amplikoni lugemite olemasolu tõttu emasproovides.

Käitusesisene ülekandumine võib tekkida klatri loomisel, indeksi tsükli aluse nimetamistel ja proovi demultipleksimisel. Proovi ülekande analüüsimiseks sekveneerimiskäituse sees sekveneeriti iga isas- ja emasproovi 46 replikaadist ja lisaks neljast puuduva malliga kontrollmaterjalist koosnevat teegikogumit üks kord seadmes NextSeq 550Dx. Käitusesisest proovi ülekandumist hinnati, võrreldes iga emasreplikaadi Y-kromosoomi amplikoni katvust kõigi kogumis olevate isasreplikaatide Y-kromosoomi amplikoni katvusega. Käitusesisese ülekande mediaanväärtus oli 0,084%.

Käitustevahelise ülekande analüüsimiseks valmistati ette kaks teegikogumit ja neid sekveneeriti järjestikku ühes seadmes NextSeq 550Dx. Esimene kogum sisaldas emasproovide 46 replikaati ja lisaks kaht puuduva malliga kontrollmaterjali. Teine kogum sisaldas isasproovide 46 replikaati ja lisaks kaht puuduva malliga kontrollmaterjali. Mõlema kogumiga kasutati sama indeksadapterite komplekti. Emaskogumit sekveneeriti esimesena, millele järgnes isaskogumi sekveneerimiskäitus, millele omakorda järgnes emaskogumi sekveneerimiskäituse kordus. Käitustevahelist proovi ülekandumist analüüsiti, võrreldes Y-kromosoomi amplikoni katvust emaskogumi korduskäituse ja isaskogumi käituse vastavate replikaatide vahel. Käitustevahelise ülekande mediaanväärtus oli 0,0076%.

## DNA sisend

### Veri (idutee)

Seadme NextSeq 550Dx jaoks tehti kindlaks vere DNA sisendi vahemik seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx teegi ettevalmistuses, kasutades idutee variandi mooduli töövoogu. Seda vahemikku hinnati jadalahjenduse uuringuga, kasutades 13 platinagenoomi proovi näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses 23 eri kromosoomis. Teeki sekveneeriti kahes seadmes NextSeq 550Dx, kasutades üht seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) partiid.

Viit proovi analüüsiti duplikaatidena viiel DNA sisendi tasemel vahemikus 250 ng kuni 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ja 12 ng). Kaheksat proovi analüüsiti ühe replikaadina igal viiest DNA sisendi tasemest. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi genotüüpe platinagenoomide versiooniga 2016-1.0. Tulemused määrati iga sisendtaseme kohta. Iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) PPA on toodud [Tabelis 1](#); NPA on toodud [Tabelis 2](#). Kõigi sisendtasemete täpsus oli sarnane. Seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx soovituslik DNA sisend on 50 ng vastavalt ülem- ja alampiiriga 25 ng ja 100 ng, et olla vastavuses toimivusnäitajatega.

Tabelis 1 Iga DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi

| DNA sisend (ng) | Variandi tüüp | Eeldatavad variandid | TP   | VN | Nimetuseta variant | PPA (%) |
|-----------------|---------------|----------------------|------|----|--------------------|---------|
| 12              | SNV           | 2412                 | 2381 | 31 | 0                  | 98,7    |
| 25              |               |                      | 2404 | 8  | 0                  | 99,7    |
| 50              |               |                      | 2403 | 9  | 0                  | 99,6    |
| 100             |               |                      | 2412 | 0  | 0                  | 100     |
| 250             |               |                      | 2412 | 0  | 0                  | 100     |
| 12              | Insertsioon   | 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              | Deletsioon    | 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     |

Tabelis 2 NPA iga DNA sisendi kohta

| DNA sisend (ng) | TN     | VP | Nimetuseta referents | 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 (somaatiline)

Seadme NextSeq 550Dx jaoks tehti kindlaks formaliiniga fikseeritud parafiinis (FFPE) DNA sisendi vahemik seadme TruSeq kohandatud amplokoni komplekti Dx teegi ettevalmistuses, kasutades somaatilise variandi mooduli töövoogu. DNA sisendi vahemikku hinnati jadalahjenduse uuringuga, kasutades kolme platinagenoomi proovi näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses 23 eri kromosoomis. Platinagenoomi rakuliinid GM12878 ja GM12877 fikseeriti formaliiniga ja pandi parafiini, seejärel eraldati DNA. GM12878 lahjendati GM12877-ga, nii et 81 variandi (55 SNV-d, 10 insertsiooni ja 16 deletsiooni) variantalleeli sagedused (VAF-id) olid väärtuse 0,025, 0,05, või 0,10 ligiduses. Peale selle oli igal proovil 91 varianti kõrgema variandi sagedusega, kuni 1,0 VAF. Proove töödeldi duplikaatidena viiel DNA sisendi tasemel, keskmise delta kvantitatiivse tsükli (dCq) väärtustega 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 ja 7,8, mõõdetuna seadme TruSeq kohandatud amplokoni komplektiga Dx – FFPE QC. Iga teeki sekveneeriti kahes seadmes NextSeq 550Dx, kasutades kaht seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) partiid. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi variandi nimetusi platinagenoomi versiooniga 2016-1.0. Iga variandi tüübi (SNV-d, insertsioonid ja deletsioonid) PPA on toodud Tabelis 3; NPA on toodud Tabelis 4. VAF-iga 0,05 või kõrgemal väärtusel variantide soovituslik DNA sisend on dCq ≤ 4 alampiiriga 4,6, et vastata toimivusnäitajatele.

Tabelis 3 Iga DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi

| Keskmine dCq | Variandi tüüp | Eeldatavad variandid | Eeldatavad puuduvad nimetused | Sihtlahjenduse VAF |         |                    |         |                    |         |
|--------------|---------------|----------------------|-------------------------------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
|              |               |                      |                               | 0,025              |         | 0,05               |         | 0,10               |         |
|              |               |                      |                               | Nimetuseta variant | PPA (%) | Nimetuseta variant | PPA (%) | Nimetuseta variant | PPA (%) |
| 2,1          | SNV           | 808                  | Ei kohaldata                  | 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          | Insertsioon   | 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          | Deletsioon    | 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    |

Tabelis 4 Iga DNA sisendi NPA

| Keskmine dCq | Eeldatav metsiktüüp | Sihtlahjenduse VAF   |         |                      |         |                      |         |
|--------------|---------------------|----------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
|              |                     | 0,025                |         | 0,05                 |         | 0,10                 |         |
|              |                     | Nimetuseta referents | NPA (%) | Nimetuseta referents | NPA (%) | Nimetuseta referents | 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  |

### Analüütiline tundlikkus (kriitiline väärtus (LoB) ja avastamispiir (LoD))

See uuring viidi läbi, et hinnata somaatilise variandi mooduli kriitilist väärtust (LoB) ja avastamispiiri (LoD) seadmel NextSeq 550Dx. See viidi läbi näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses 23 eri kromosoomis. Plaatinagenoomi rakuliinid GM12878 ja GM12877 fikseeriti formaliiniga ja sisestati parafiini, seejärel eraldati DNA. GM12878 lahjendati GM12877-ga, nii et 74 variandi (53 SNV-d, 7 insertsiooni ja 14 deletsiooni) variandi sagedus olid  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 ja lahjendatud GM12878 (GM12878-D) analüüsiti kuuel järjestikusel päeval ühe seadmega, kasutades vaheldumisi kaht seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) partiid, kokku tehti kuus sekveneerimiskäitust. See analüüs andis iga variandi kohta 60 replikaati GM12878-D korral ja 72 replikaati iga vastava metsiktüüpi koordinaadi kohta GM12877 korral iga reaktiivikomplekti kohta. LoB ja LoD arutati protokollis CLSI EP17-A2 esitatud klassikalise lähenemisega, kasutades mitteparameetrist valikut. LoB ja LoD arutati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta eraldi, koondades konkreetse variandi tüübi variandi sagedused. I tüüpi viga määrati väärtusega 0,01 ja II tüüpi viga väärtusega 0,05.

LoB jaoks sorditi koondatud variandi sagedused madalaimast kõrgeimani ja arvutati iga variandi tüübi iga reaktiivikomplekti 99. järgu positsioon (Tabelis 5). Somaatilise variandi moodul kasutab variantide kvalitatiivseks tuvastamiseks piirväärtust (tegelik LoB) 0,026 VAF. Arvutatud LoB kinnitas, et see piirväärtus annab tulemuseks I tüüpi vea, mille väärtus pole suurem kui 0,01.

Tabelis 5 Kriitiline väärtus

| Variandi tüüp | Vaatlusi kokku | LoB reaktiivipartii 1 (%) | LoB reaktiivipartii 2 (%) |
|---------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| SNV           | 3816           | 0,77                      | 0,77                      |
| Insertsioon   | 504            | 0,56                      | 0,56                      |
| Deletsioon    | 1008           | 1,20                      | 1,20                      |

LoD jaoks arvutati piirväärtusest 0,026 allapoole jäävate kõigi variandi tüüpide iga reaktiivikomplekti individuaalse mutatsiooni sageduse protsent (Tabelis 6). Kuna protsendid olid madalamad kui II tüüpi viga 5% (0,05), arvutati liidetud variandi sagedused LoD-na (Tabelis 6). Iga variandi tüübi LoD võeti kahe reaktiivikomplekti kohta arvutatud kahest väärtusest suuremana – 4,97% SNV-de korral, 5,12% insertsioonide korral ja 5,26% deletsioonide korral.

Tabelis 6 Avastamispiir

| Reaktiivipartii | Variandi tüüp | Vaatlusi kokku | VAF-mõõtmiste arv < 2,6% | VAF-mõõtmiste % < 2,6% | Avastamispiir (%) |
|-----------------|---------------|----------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| 1               | SNV           | 3180           | 53                       | 1,7                    | 4,94              |
|                 | Insertsioon   | 420            | 6                        | 1,4                    | 5,08              |
|                 | Deletsioon    | 840            | 7                        | 0,8                    | 5,22              |
| 2               | SNV           | 3180           | 51                       | 1,6                    | 4,97              |
|                 | Insertsioon   | 420            | 5                        | 1,2                    | 5,12              |
|                 | Deletsioon    | 840            | 7                        | 0,80                   | 5,26              |

## Täpsus

### Idutee

Läbi viidi järgmine uuring, et hinnata seadme NextSeq 550Dx idutee variandi mooduli variandi nimetuse täpsust, kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli). Analüüsiti 13 kordumatu plaatinagenoomi proovi, kasutades näitlikku analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses (150 amplikoni) 23 eri kromosoomis. Kokku tehti üheksa käitust, kasutades viie päeva jooksul kolme sekveneerimisseadet, kolme reaktiivipartiid ja kolme operaatorit. Täpsus määrati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, plaatinagenoomi versiooniga 2016-1.0. Usaldusväärsed genoomsed piirkonnad määrati selle referentsmeetodi põhjal, kui pole öeldud teisiti.

Tabelis 7 Idutee ühtivuse kokkuvõte

| Kriteeriumid       | Vaatlusi kokku <sup>1</sup> | Tulemus vaatluse järgi <sup>2</sup> | Tulemus käituse järgi <sup>3</sup> |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| SNV PPA            | 819                         | 98,7                                | > 99,9                             |
| Insertsioonide PPA | 819                         | 95,0                                | 98,9                               |
| Deletsioonide PPA  | 819                         | 100                                 | 100                                |
| NPA                | 819                         | 100                                 | 100                                |
| OPA                | 819                         | > 99,9                              | > 99,9                             |

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta (91) × käituste arv (9) = 819.

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadina kõigis 9 käituses.

<sup>3</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

**Tabelis 8** sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse platinagenoomi versiooniga 2016-1.0 PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

Tabelis 8 Idutee ühtivus proovi kohta

| Proov   | Keskmine nimetuse määr | Eeldatavad variandid <sup>1</sup> | TP   | VN | Nimetuseta variant | TN     | VP | PPA    | NPA | OPA    |
|---------|------------------------|-----------------------------------|------|----|--------------------|--------|----|--------|-----|--------|
| NA12877 | > 99,9                 | 4788                              | 4788 | 0  | 0                  | 756762 | 0  | 100    | 100 | 100    |
| NA12878 | > 99,9                 | 8505                              | 8379 | 1  | 125                | 751464 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |
| NA12879 | > 99,9                 | 6048                              | 5985 | 5  | 58                 | 757701 | 0  | 99,9   | 100 | > 99,9 |
| NA12880 | > 99,9                 | 6993                              | 6930 | 0  | 63                 | 757638 | 0  | 100    | 100 | 100    |
| NA12881 | > 99,9                 | 7875                              | 7811 | 3  | 61                 | 751653 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |
| NA12882 | > 99,9                 | 6300                              | 6174 | 3  | 123                | 754803 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |
| NA12883 | > 99,9                 | 7119                              | 7056 | 0  | 63                 | 751905 | 0  | 100    | 100 | 100    |
| NA12884 | > 99,9                 | 7182                              | 7119 | 6  | 57                 | 754146 | 0  | 99,9   | 100 | > 99,9 |
| NA12885 | > 99,9                 | 7686                              | 7560 | 2  | 124                | 754173 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |
| NA12886 | > 99,9                 | 7245                              | 7182 | 7  | 56                 | 752469 | 0  | 99,9   | 100 | > 99,9 |
| NA12887 | > 99,9                 | 7119                              | 7119 | 0  | 0                  | 750645 | 0  | 100    | 100 | 100    |
| NA12888 | > 99,9                 | 6804                              | 6804 | 0  | 0                  | 756065 | 0  | 100    | 100 | 100    |
| NA12893 | > 99,9                 | 7434                              | 7371 | 1  | 62                 | 750015 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |

<sup>1</sup> Variantide koguarv kõikides proovi replikaatides kõigis 9 käituses.

**Tabelis 9** sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

Tabelis 9 Idutee ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal

| > proov | SNV-d      |      |      | Insertioonid |      |      | Deletsioonid |      |    |
|---------|------------|------|------|--------------|------|------|--------------|------|----|
|         | > eeldatav | > TP | > VN | > eeldatav   | > TP | > VN | Eeldatav     | TP   | VN |
| 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  |

Proove analüüsiti väikeste insertioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas. Üldine kokkuvõte on toodud **Tabelis 10**. Kokku oli 71 indelit suurusega vahemikus 1–24 bp (insertioonid) ja 1–25 bp (deletsioonid).

Tabelis 10 Idutee indelite tuvastuse kokkuvõte

| Variandi tüüp | Eeldatavad variandid | TP    | VN | Nimetuseta variant | PPA  |
|---------------|----------------------|-------|----|--------------------|------|
| Insertsioon   | 18522                | 18018 | 27 | 477                | 99,9 |
| Deletsioon    | 17388                | 17073 | 0  | 315                | 100  |



Näitlik analüüs koosnes 150 amplikonist, mis on mõeldud katma mitmesugust genoomset sisu. Amplikonide GC sisaldus oli vahemikus 0,19–0,87. Amplikonidel oli ka mitmeid erinevaid üksiknukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed pandi kokku amplikonipõhiselt (Tabelis 11), et määrata genoomse sisu mõju õigete nimetuste protsendile. Õigete nimetuste protsent sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on vähem kui 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvaid nimetusi.

Tabelis 11 Idutee täpsus amplikoni tasemel

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                 | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 1        | 1         | 36450499        | 36450591       | 93                           | 93                        | Indel                                   | 0,22        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |
| 2        | 1         | 109465122       | 109465200      | 79                           | 79                        | Polü A (5),<br>Polü C (5),<br>indel     | 0,38        | 64701           | 0               | 0                  | 100                |
| 3        | 1         | 218353867       | 218353957      | 91                           | 91                        | Indel                                   | 0,4         | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 4        | 1         | 223906657       | 223906748      | 92                           | 92                        | Indel                                   | 0,49        | 75348           | 0               | 0                  | 100                |
| 5        | 1         | 228526602       | 228526682      | 81                           | 81                        | Polü G (5)                              | 0,69        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 6        | 1         | 236372039       | 236372108      | 70                           | 70                        | Polü T (10),<br>indel                   | 0,39        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |
| 7        | 1         | 247812041       | 247812128      | 88                           | 88                        | Polü A (5),<br>CT(3), TAA (3),<br>indel | 0,27        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 8        | 2         | 55862774        | 55862863       | 90                           | 90                        | Indel                                   | 0,28        | 73710           | 0               | 0                  | 100                |
| 9        | 2         | 87003930        | 87004009       | 80                           | 80                        | Indel                                   | 0,38        | 65520           | 0               | 0                  | 100                |
| 10       | 2         | 177016721       | 177016805      | 85                           | 81                        | Ei kohaldata                            | 0,65        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 11       | 2         | 186625727       | 186625801      | 75                           | 75                        | Polü A (8)                              | 0,35        | 61425           | 0               | 0                  | 100                |
| 12       | 2         | 190323504       | 190323591      | 88                           | 88                        | Polü T (5)                              | 0,42        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 13       | 2         | 200796740       | 200796826      | 87                           | 87                        | Polü T (5),<br>indel                    | 0,31        | 71253           | 0               | 0                  | 100                |
| 14       | 2         | 212245049       | 212245139      | 91                           | 91                        | Polü T (5),<br>Polü A (6),<br>indel     | 0,3         | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 15       | 2         | 228147052       | 228147144      | 93                           | 93                        | Indel                                   | 0,43        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 16       | 2         | 235016350       | 235016422      | 73                           | 73                        | Polü T (5), indel                         | 0,42        | 59787           | 0               | 0                  | 100                |
| 17       | 3         | 4466229         | 4466321        | 93                           | 93                        | AT(3), indel                              | 0,27        | 74823           | 0               | 1344               | 98,2               |
| 18       | 3         | 46620561        | 46620643       | 83                           | 83                        | Ei kohaldata                              | 0,43        | 67977           | 0               | 0                  | 100                |
| 19       | 3         | 49851331        | 49851400       | 70                           | 70                        | CT(3), indel                              | 0,49        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |
| 20       | 3         | 189713161       | 189713248      | 88                           | 88                        | Polü A (5), Polü T (5), Polü A (9), TG(3) | 0,41        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 21       | 3         | 190106030       | 190106104      | 75                           | 74                        | Indel                                     | 0,57        | 60543           | 0               | 63                 | 99,9               |
| 22       | 4         | 2233667         | 2233744        | 78                           | 78                        | Polü A (6)                                | 0,26        | 63882           | 0               | 0                  | 100                |
| 23       | 4         | 7780541         | 7780637        | 97                           | 97                        | Polü G (6), Polü T (5), Polü A (5)        | 0,42        | 79443           | 0               | 0                  | 100                |
| 24       | 4         | 15688604        | 15688681       | 78                           | 78                        | Ei kohaldata                              | 0,29        | 63882           | 0               | 0                  | 100                |
| 25       | 4         | 56236521        | 56236586       | 66                           | 62                        | Polü A (5), indel                         | 0,36        | 50778           | 0               | 0                  | 100                |
| 26       | 4         | 102839244       | 102839314      | 71                           | 69                        | Polü A (5)                                | 0,46        | 56511           | 0               | 0                  | 100                |
| 27       | 4         | 164446743       | 164446804      | 62                           | 62                        | Polü A (7), indel                         | 0,27        | 50778           | 0               | 0                  | 100                |
| 28       | 5         | 1882081         | 1882158        | 78                           | 75                        | Ei kohaldata                              | 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                        | Ei kohaldata                              | 0,39        | 52416           | 0               | 0                  | 100                |
| 31       | 5         | 74077114        | 74077196       | 83                           | 83                        | Polü A (6), indel                         | 0,3         | 67977           | 0               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu       | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 32       | 5         | 147475343       | 147475409      | 67                           | 67                        | Polü T (5)                    | 0,37        | 54873           | 0               | 0                  | 100                |
| 33       | 5         | 149323731       | 149323821      | 91                           | 91                        | CT(4), AG (3)                 | 0,55        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 34       | 5         | 155662213       | 155662287      | 75                           | 75                        | Indel                         | 0,43        | 61425           | 0               | 0                  | 100                |
| 35       | 6         | 6318713         | 6318814        | 102                          | 102                       | Polü G (6)                    | 0,68        | 83538           | 0               | 0                  | 100                |
| 36       | 6         | 24949983        | 24950074       | 92                           | 92                        | Indel                         | 0,63        | 75348           | 0               | 0                  | 100                |
| 37       | 6         | 31084900        | 31084999       | 100                          | 94                        | GCT(5), indel                 | 0,61        | 76608           | 0               | 378                | 99,5               |
| 38       | 6         | 32147987        | 32148084       | 98                           | 98                        | Polü T (5), TCT(3), CTT(3)    | 0,55        | 80262           | 0               | 0                  | 100                |
| 39       | 6         | 32986864        | 32986958       | 95                           | 95                        | Indel                         | 0,53        | 77805           | 0               | 0                  | 100                |
| 40       | 6         | 33408498        | 33408583       | 86                           | 86                        | Polü C (6)                    | 0,7         | 70434           | 0               | 0                  | 100                |
| 41       | 6         | 41647401        | 41647495       | 95                           | 94                        | Polü G (5), indel             | 0,61        | 76986           | 0               | 0                  | 100                |
| 42       | 6         | 112435865       | 112435955      | 91                           | 91                        | Polü A (5)                    | 0,44        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 43       | 7         | 22202076        | 22202148       | 73                           | 73                        | Ei kohaldata                  | 0,44        | 59787           | 0               | 0                  | 100                |
| 44       | 7         | 66276100        | 66276187       | 88                           | 88                        | Indel                         | 0,35        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 45       | 7         | 77365735        | 77365821       | 87                           | 87                        | Polü A (7), AG(4)             | 0,26        | 71253           | 0               | 0                  | 100                |
| 46       | 7         | 110939946       | 110940030      | 85                           | 85                        | Indel                         | 0,38        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 47       | 7         | 128533468       | 128533557      | 90                           | 90                        | Polü G (5), indel             | 0,62        | 73710           | 0               | 0                  | 100                |
| 48       | 7         | 149503875       | 149503965      | 91                           | 91                        | Polü G (6), Polü C (6), indel | 0,71        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 49       | 7         | 154404519       | 154404599      | 81                           | 66                        | Ei kohaldata                  | 0,31        | 54054           | 0               | 0                  | 100                |
| 50       | 7         | 156476507       | 156476599      | 93                           | 93                        | Indel                         | 0,35        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 51       | 8         | 1817312         | 1817394        | 83                           | 83                        | Ei kohaldata              | 0,42        | 67977           | 0               | 0                  | 100                |
| 52       | 8         | 24811020        | 24811109       | 90                           | 89                        | Polü G (7), CTC(4), indel | 0,61        | 72171           | 0               | 720                | 99,0               |
| 53       | 8         | 76518625        | 76518691       | 67                           | 67                        | Indel                     | 0,3         | 54873           | 0               | 0                  | 100                |
| 54       | 9         | 103054909       | 103055006      | 98                           | 98                        | Polü G (6)                | 0,67        | 80262           | 0               | 0                  | 100                |
| 55       | 9         | 105586150       | 105586214      | 65                           | 65                        | Indel                     | 0,32        | 53235           | 0               | 0                  | 100                |
| 56       | 9         | 107620823       | 107620918      | 96                           | 96                        | Ei kohaldata              | 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                        | Polü C (6), indel         | 0,68        | 79443           | 0               | 0                  | 100                |
| 59       | 10        | 5987120         | 5987198        | 79                           | 78                        | Polü G (5), indel         | 0,47        | 63882           | 0               | 0                  | 100                |
| 60       | 10        | 11784629        | 11784726       | 98                           | 91                        | GC(3)                     | 0,87        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 61       | 10        | 27317777        | 27317855       | 79                           | 79                        | Polü T (5)                | 0,3         | 64701           | 0               | 0                  | 100                |
| 62       | 10        | 33018351        | 33018440       | 90                           | 90                        | Polü A (5), Polü T (5)    | 0,2         | 73710           | 0               | 0                  | 100                |
| 63       | 10        | 45084159        | 45084253       | 95                           | 95                        | Indel                     | 0,35        | 77805           | 0               | 0                  | 100                |
| 64       | 10        | 55892599        | 55892687       | 89                           | 88                        | AC(11), indel             | 0,42        | 71747           | 0               | 325                | 99,5               |
| 65       | 10        | 101611250       | 101611329      | 80                           | 80                        | Ei kohaldata              | 0,49        | 65520           | 0               | 0                  | 100                |
| 66       | 10        | 118351373       | 118351453      | 81                           | 81                        | Ei kohaldata              | 0,51        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 67       | 11        | 8159816         | 8159912        | 97                           | 96                        | Ei kohaldata              | 0,45        | 78624           | 0               | 0                  | 100                |
| 68       | 11        | 30177648        | 30177717       | 70                           | 70                        | Indel                     | 0,46        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 69       | 11        | 47470345        | 47470444       | 100                          | 100                       | Ei kohaldata                              | 0,65        | 81900           | 0               | 0                  | 100                |
| 70       | 11        | 59837679        | 59837740       | 62                           | 62                        | Indel                                     | 0,37        | 50778           | 0               | 0                  | 100                |
| 71       | 11        | 64418856        | 64418957       | 102                          | 102                       | Ei kohaldata                              | 0,59        | 83538           | 0               | 0                  | 100                |
| 72       | 11        | 93529612        | 93529684       | 73                           | 73                        | Polü A (5)                                | 0,4         | 59787           | 0               | 0                  | 100                |
| 73       | 11        | 101347052       | 101347136      | 85                           | 85                        | Ei kohaldata                              | 0,42        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 74       | 11        | 102477336       | 102477426      | 91                           | 91                        | Polü G (6)                                | 0,55        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 75       | 11        | 118406285       | 118406369      | 85                           | 85                        | Indel                                     | 0,53        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 76       | 11        | 120357801       | 120357885      | 85                           | 85                        | Polü A (5), CA(3), indel                  | 0,34        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 77       | 11        | 125769313       | 125769397      | 85                           | 85                        | GA(3)                                     | 0,52        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 78       | 12        | 2834770         | 2834853        | 84                           | 84                        | Polü C (5), indel                         | 0,52        | 68796           | 0               | 0                  | 100                |
| 79       | 12        | 26811004        | 26811096       | 93                           | 93                        | Polü A (7), AC(4)                         | 0,33        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |
| 80       | 12        | 30881766        | 30881846       | 81                           | 81                        | Ei kohaldata                              | 0,49        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 81       | 12        | 88474105        | 88474175       | 71                           | 71                        | Polü A (6)                                | 0,35        | 58149           | 0               | 0                  | 100                |
| 82       | 12        | 120966872       | 120966966      | 95                           | 95                        | Polü G (5)                                | 0,68        | 77805           | 0               | 0                  | 100                |
| 83       | 13        | 24167504        | 24167576       | 73                           | 73                        | Ei kohaldata                              | 0,52        | 59787           | 0               | 0                  | 100                |
| 84       | 13        | 25816961        | 25817049       | 89                           | 88                        | Polü A (5), Polü T (7), Polü A (7), indel | 0,22        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 85       | 13        | 44880112        | 44880200       | 89                           | 89                        | Indel                                     | 0,49        | 72891           | 0               | 0                  | 100                |
| 86       | 13        | 77665218        | 77665294       | 77                           | 77                        | Indel                                     | 0,39        | 63063           | 0               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 87       | 14        | 31619327        | 31619393       | 67                           | 67                        | GA(3), TA (3)           | 0,39        | 54873           | 0               | 0                  | 100                |
| 88       | 14        | 39517884        | 39517966       | 83                           | 83                        | Ei kohaldata            | 0,25        | 67977           | 0               | 0                  | 100                |
| 89       | 14        | 46958962        | 46959034       | 73                           | 72                        | Polü T (5), indel       | 0,19        | 58642           | 0               | 326                | 99,4               |
| 90       | 14        | 58050030        | 58050110       | 81                           | 81                        | Indel                   | 0,38        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 91       | 14        | 82390559        | 82390649       | 91                           | 91                        | Indel                   | 0,35        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 92       | 14        | 92549544        | 92549609       | 66                           | 66                        | Polü A (5)              | 0,41        | 54054           | 0               | 0                  | 100                |
| 93       | 14        | 102808496       | 102808589      | 94                           | 94                        | Indel                   | 0,62        | 76986           | 0               | 0                  | 100                |
| 94       | 15        | 43170751        | 43170848       | 98                           | 96                        | Polü C (5)              | 0,45        | 78624           | 0               | 0                  | 100                |
| 95       | 15        | 63446149        | 63446216       | 68                           | 68                        | Indel                   | 0,25        | 55692           | 0               | 0                  | 100                |
| 96       | 15        | 77879807        | 77879901       | 95                           | 93                        | Polü G (5), indel       | 0,68        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |
| 97       | 15        | 81625334        | 81625428       | 95                           | 95                        | Polü T (6)              | 0,43        | 77805           | 0               | 0                  | 100                |
| 98       | 15        | 85438263        | 85438334       | 72                           | 71                        | Indel                   | 0,65        | 58149           | 0               | 0                  | 100                |
| 99       | 15        | 89817413        | 89817503       | 91                           | 91                        | Ei kohaldata            | 0,36        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 100      | 15        | 89864274        | 89864343       | 70                           | 70                        | Indel                   | 0,56        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |
| 101      | 16        | 1894910         | 1894972        | 63                           | 63                        | Ei kohaldata            | 0,27        | 51597           | 0               | 0                  | 100                |
| 102      | 16        | 28997904        | 28997998       | 95                           | 95                        | Polü 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                       | Polü C (5)              | 0,67        | 85176           | 0               | 0                  | 100                |
| 105      | 16        | 85706375        | 85706465       | 91                           | 91                        | Polü T (5), indel       | 0,37        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 106      | 17        | 3563920         | 3564008        | 89                           | 89                        | GC(3)                   | 0,64        | 72891           | 0               | 0                  | 100                |
| 107      | 17        | 3594191         | 3594277        | 87                           | 87                        | Polü C (5), indel       | 0,67        | 71247           | 0               | 6                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|--|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 108      | 17        | 3970090         | 3970180        | 91                           | 91                        | Indel                                  | 0,46        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 109      | 17        | 16084945        | 16085037       | 93                           | 93                        | Indel                                  | 0,26        | 76167           | 0               | 0                  | 100                |
| 110      | 17        | 33998759        | 33998849       | 91                           | 89                        | Polü T (5)                             | 0,54        | 72891           | 0               | 0                  | 100                |
| 111      | 17        | 39589691        | 39589774       | 84                           | 82                        | Polü A (13), indel (x2)                | 0,29        | 66343           | 27              | 788                | 98,8               |
| 112      | 17        | 41244394        | 41244484       | 91                           | 91                        | Polü A (5)                             | 0,34        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 113      | 17        | 45438866        | 45438957       | 92                           | 92                        | Polü A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel | 0,26        | 75348           | 0               | 0                  | 100                |
| 114      | 17        | 61502432        | 61502510       | 79                           | 79                        | Indel                                  | 0,41        | 64413           | 0               | 288                | 99,6               |
| 115      | 17        | 64023582        | 64023667       | 86                           | 86                        | Polü 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                        | Ei kohaldata                           | 0,37        | 74529           | 0               | 0                  | 100                |
| 119      | 18        | 9888026         | 9888094        | 69                           | 69                        | Polü A (6), TG(3)                      | 0,43        | 56511           | 0               | 0                  | 100                |
| 120      | 18        | 38836999        | 38837073       | 75                           | 75                        | Polü A (5), indel                      | 0,37        | 61425           | 0               | 0                  | 100                |
| 121      | 18        | 47405382        | 47405462       | 81                           | 81                        | CTC(3), indel                          | 0,47        | 66339           | 0               | 0                  | 100                |
| 122      | 18        | 54815665        | 54815749       | 85                           | 85                        | CT(3), indel                           | 0,45        | 69615           | 0               | 0                  | 100                |
| 123      | 18        | 59773996        | 59774060       | 65                           | 65                        | Ei kohaldata                           | 0,48        | 53235           | 0               | 0                  | 100                |
| 124      | 19        | 625143          | 625241         | 99                           | 99                        | Ei kohaldata                           | 0,59        | 81081           | 0               | 0                  | 100                |
| 125      | 19        | 18121418        | 18121491       | 74                           | 74                        | Ei kohaldata                           | 0,68        | 60605           | 1               | 0                  | 100                |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu  | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 126      | 19        | 18186574        | 18186643       | 70                           | 70                        | Ei kohaldata             | 0,64        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |
| 127      | 20        | 746056          | 746149         | 94                           | 94                        | Ei kohaldata             | 0,61        | 76986           | 0               | 0                  | 100                |
| 128      | 20        | 10633195        | 10633276       | 82                           | 82                        | AC(3)                    | 0,59        | 67158           | 0               | 0                  | 100                |
| 129      | 20        | 17705633        | 17705708       | 76                           | 76                        | CT(3)                    | 0,58        | 62244           | 0               | 0                  | 100                |
| 130      | 20        | 21766821        | 21766890       | 70                           | 70                        | GT(3), TG(4), indel      | 0,46        | 57330           | 0               | 0                  | 100                |
| 131      | 20        | 25278421        | 25278521       | 101                          | 101                       | Indel                    | 0,63        | 82719           | 0               | 0                  | 100                |
| 132      | 20        | 50897302        | 50897368       | 67                           | 67                        | Indel                    | 0,36        | 54873           | 0               | 0                  | 100                |
| 133      | 20        | 62331904        | 62331994       | 91                           | 88                        | Polü G (6)               | 0,73        | 72072           | 0               | 0                  | 100                |
| 134      | 20        | 62690860        | 62690946       | 87                           | 87                        | Indel                    | 0,57        | 71253           | 0               | 0                  | 100                |
| 135      | 21        | 30300823        | 30300888       | 66                           | 66                        | Indel                    | 0,35        | 54054           | 0               | 0                  | 100                |
| 136      | 21        | 33694176        | 33694273       | 98                           | 98                        | Polü T (6), CA(3)        | 0,54        | 80262           | 0               | 0                  | 100                |
| 137      | 21        | 36710706        | 36710792       | 87                           | 87                        | GT(3), indel             | 0,39        | 71253           | 0               | 0                  | 100                |
| 138      | 21        | 46644924        | 46644992       | 69                           | 69                        | Polü A (6), AG(3), indel | 0,32        | 56439           | 0               | 72                 | 99,9               |
| 139      | 21        | 46705575        | 46705664       | 90                           | 90                        | Polü T (5), Polü A (6)   | 0,5         | 73710           | 0               | 0                  | 100                |
| 140      | 22        | 25750774        | 25750873       | 100                          | 100                       | Indel                    | 0,63        | 81900           | 0               | 0                  | 100                |
| 141      | 22        | 32439233        | 32439329       | 97                           | 97                        | Ei kohaldata             | 0,68        | 79443           | 0               | 0                  | 100                |
| 142      | 22        | 37409844        | 37409940       | 97                           | 97                        | Indel                    | 0,46        | 79443           | 0               | 0                  | 100                |
| 143      | 22        | 37637596        | 37637694       | 99                           | 99                        | Ei kohaldata             | 0,6         | 81081           | 0               | 0                  | 100                |
| 144      | 22        | 47081347        | 47081438       | 92                           | 92                        | Indel                    | 0,66        | 75348           | 0               | 0                  | 100                |
| 145      | X         | 15870424        | 15870492       | 69                           | 69                        | Polü T (5)               | 0,26        | 56511           | 0               | 0                  | 100                |



| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni<br>algus | Amplikoni<br>lõpp | Analüüsitud<br>fragmendi<br>suurus | Usalduspiirkondade<br>alused | Amplikoni<br>genoomne<br>sisu | GC<br>sisaldus | Õiged<br>nimetused | Valed<br>nimetused | Puuduvad<br>nimetused | Õigete<br>nimetuste<br>% |
|----------|-----------|--------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|
| 146      | X         | 135288543          | 135288611         | 69                                 | 69                           | Polü C (5)                    | 0,62           | 56511              | 0                  | 0                     | 100                      |
| 147      | X         | 135290777          | 135290847         | 71                                 | 71                           | Ei<br>kohaldata               | 0,52           | 58149              | 0                  | 0                     | 100                      |
| 148      | Y         | 2655397            | 2655461           | 65                                 | 0                            | Ei<br>kohaldata               | 0,55           | 0                  | 0                  | 0                     | Ei<br>kohaldata          |
| 149      | Y         | 2655519            | 2655609           | 91                                 | 0                            | Ei<br>kohaldata               | 0,48           | 0                  | 0                  | 0                     | Ei<br>kohaldata          |
| 150      | Y         | 2655609            | 2655679           | 71                                 | 0                            | Polü A (5)                    | 0,37           | 0                  | 0                  | 0                     | Ei<br>kohaldata          |

Proovi NA12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (National Institutes of Standards and Technology, NIST; v.2.19). 150 amplikonist 92 sisaldasid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 41 amplikonil oli osaline kattuvus ja 17 amplikonil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 10 000 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on toodud **Tabelis 12**.

Tabelis 12 Proovi NA12878 idutee ühtivus NIST andmebaasiga

| Proov   | Amplikonide arv | Keskmine nimetuse määr | TP   | VN | TN     | VP | PPA    | NPA | OPA    |
|---------|-----------------|------------------------|------|----|--------|----|--------|-----|--------|
| NA12878 | 133             | > 99,9                 | 6552 | 1  | 610470 | 0  | > 99,9 | 100 | > 99,9 |

Selle üheksa käitusega idutee uuringu andmete põhjal saab seadmega NextSeq 550Dx järjekindlalt sekveneerida järgmist.

- ▶ GC sisaldus  $\geq 19\%$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 19% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,6%)
- ▶ GC sisaldus  $\leq 87\%$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 87% nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- ▶ PolüA pikkused  $\leq 9$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 9-nukleotiidset PolüA kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- ▶ PolüT pikkused  $\leq 10$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 10-nukleotiidset PolüT kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- ▶ PolüG pikkused  $\leq 7$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 7-nukleotiidset PolüG kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,0%)
- ▶ PolüC pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 2457 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüC kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- ▶ Dinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 11x$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 11x dinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- ▶ Trinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 5x$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 5x trinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- ▶ Insertioonide pikkused  $\leq 24$  (66343 66370-st nimetatud alusest 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 24-nukleotiidset insertiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,2%; 24-nukleotiidset insertiooni sisaldas piirkonnas ei esinenud valesid nimetusi)
- ▶ Deletsioonide pikkused  $\leq 25$  (kõik nimetatud alused 2457 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 25-nukleotiidset deletsiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)

#### Somaatiline

Siin kirjeldatud uuringut kasutati somaatilise variandi mooduli variandi nimetamise täpsuse hindamiseks seadmes NextSeq 550Dx, kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli).

Uuringus kasutati näitlikku analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses (150 amplikonis) 23 eri kromosoomis. Plaatinagenoomi DNA eraldati FFPE-ga töödeldud plokkidest, et luua kuus kordumatut proovi selles uuringus hindamiseks.

Proovi GM12877 DNA-d lahjendati proovi GM12878 DNA-ga, et luua GM12877-D5 ja GM12877-D7 kordumatute heterosügootsete variantide kogumina variandi sagedusega väärtuste 5% ja 7% lähedal. Proovi GM12878 DNA-d lahjendati sarnaselt proovi GM12877 DNA-ga, et luua GM12878-D5 ja GM12878-D7. Kõiki proove analüüsiti kolmes eksemplaris, v.a lahjendatud proove, mida analüüsiti kuue replikaadina. Kokku tehti üheksa käitust, kasutades viie päeva jooksul kolme sekveneerimiseadet, kolme reaktiivipartiid ja kolme operaatorit. Täpsus määrati SNV-de, insertioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, plaatinagenoomi versiooniga 2016-1.0. Usaldusväärsed genoomsed piirkonnad määrati selle referentsmeetodi põhjal, kui pole öeldud teisiti.

Tabelis 13 Somaatilise ühtivuse kokkuvõte

| Kriteeriumid       | Vaatlusi kokku <sup>1</sup> | Tulemus vaatluse järgi <sup>2</sup> | Tulemus käituse järgi <sup>3</sup> |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| SNV PPA            | 378                         | 98,9                                | 99,9                               |
| Insertsioonide PPA | 378                         | 96,9                                | 99,9                               |
| Deletsioonide PPA  | 378                         | 97,1                                | 99,9                               |
| NPA                | 378                         | > 99,9                              | > 99,9                             |
| OPA                | 378                         | > 99,9                              | > 99,9                             |

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta (42) × käituste arv (9) = 378.

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõigis 9 käituses.

<sup>3</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

**Tabelis 14** sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertsioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertsioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

Tabelis 14 Somaatiline ühtivus proovi kohta

| Proov      | Keskmine nimetuse määr | Eeldatav | TP   | VN | Nimetuseta variant | TN     | VP | 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    |

**Tabelis 15** sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüüpi (SNV-d, insertsioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

Tabelis 15 Somaatiline ühtivus proovi kohta variandi tüüpi põhjal

| Proov      | SNV-d    |      |    | Insertsioonid |      |    | Deletsioonid |      |    |
|------------|----------|------|----|---------------|------|----|--------------|------|----|
|            | Eeldatav | TP   | VN | Eeldatav      | TP   | VN | Eeldatav     | TP   | VN |
| 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  |

| Proov      | SNV-d    |      |    | Insertsioonid |      |    | Deletsioonid |      |    |
|------------|----------|------|----|---------------|------|----|--------------|------|----|
|            | Eeldatav | TP   | VN | Eeldatav      | TP   | VN | Eeldatav     | TP   | VN |
| GM12878-D5 | 5454     | 5192 | 28 | 1782          | 1651 | 9  | 2052         | 1856 | 5  |
| GM12878-D7 | 5454     | 5445 | 0  | 1782          | 1719 | 0  | 2052         | 1944 | 0  |

Kümme proovi analüüsi väikeste insertsioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas (Tabelis 16). Kokku oli 71 indelit suurusega vahemikus 1–24 bp (insertsioonid) ja 1–25 bp (deletsioonid).

Tabelis 16 Somaatilise indeli tuvastuse kokkuvõte

| Variandi tüüp | Eeldatavad variandid | TP    | VN | Nimetuseta variant | PPA    |
|---------------|----------------------|-------|----|--------------------|--------|
| Insertsioon   | 10773                | 10282 | 9  | 482                | 99,2   |
| Deletsioon    | 11502                | 10667 | 5  | 830                | > 99,9 |

150 ampliconi olid ette nähtud katma mitmesugust genoomset sisu. Ampliconide GC sisaldus oli vahemikus 0,19–0,87%. Ampliconidel oli ka mitmeid erinevaid üksiku nukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed pandi kokku ampliconipõhiselt (Tabelis 17), et määrata genoomse sisu mõju õigete nimetuste protsendile. Õigete nimetuste protsent sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on vähem kui 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvaid nimetusi.

Tabelis 17 Somaatiline täpsus ampliconi tasemel

| Amplicon | Kromosoom | Ampliconi algus | Ampliconi lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Ampliconi genoomne sisu                 | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 1        | 1         | 36450499        | 36450591       | 93                           | 93                        | Indel                                   | 0,22        | 35066           | 0               | 88                 | 99,7               |
| 2        | 1         | 109465122       | 109465200      | 79                           | 79                        | Polü A (5),<br>Polü C (5),<br>indel     | 0,38        | 29827           | 0               | 35                 | 99,9               |
| 3        | 1         | 218353867       | 218353957      | 91                           | 91                        | Indel                                   | 0,4         | 34202           | 0               | 283                | 99,2               |
| 4        | 1         | 223906657       | 223906748      | 92                           | 92                        | Indel                                   | 0,49        | 34613           | 0               | 163                | 99,5               |
| 5        | 1         | 228526602       | 228526682      | 81                           | 81                        | Polü G (5)                              | 0,69        | 30571           | 0               | 47                 | 99,8               |
| 6        | 1         | 236372039       | 236372108      | 70                           | 70                        | Polü T (10),<br>indel                   | 0,39        | 26452           | 0               | 8                  | 100,0              |
| 7        | 1         | 247812041       | 247812128      | 88                           | 88                        | Polü A (5),<br>CT(3), TAA (3),<br>indel | 0,27        | 33148           | 0               | 116                | 99,7               |
| 8        | 2         | 55862774        | 55862863       | 90                           | 90                        | Indel                                   | 0,28        | 33928           | 0               | 92                 | 99,7               |
| 9        | 2         | 87003930        | 87004009       | 80                           | 80                        | Indel                                   | 0,38        | 30218           | 0               | 22                 | 99,9               |
| 10       | 2         | 177016721       | 177016805      | 85                           | 81                        | Ei kohaldata                            | 0,65        | 30616           | 0               | 2                  | > 99,9             |
| 11       | 2         | 186625727       | 186625801      | 75                           | 75                        | Polü A (8)                              | 0,35        | 28017           | 0               | 499                | 98,3               |
| 12       | 2         | 190323504       | 190323591      | 88                           | 88                        | Polü T (5)                              | 0,42        | 33207           | 0               | 57                 | 99,8               |
| 13       | 2         | 200796740       | 200796826      | 87                           | 87                        | Polü T (5),<br>indel                    | 0,31        | 32524           | 9               | 718                | 97,8               |
| 14       | 2         | 212245049       | 212245139      | 91                           | 91                        | Polü T (5),<br>Polü A (6),<br>indel     | 0,3         | 33972           | 0               | 456                | 98,7               |
| 15       | 2         | 228147052       | 228147144      | 93                           | 93                        | Ei kohaldata                            | 0,43        | 35051           | 0               | 103                | 99,7               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 16       | 2         | 235016350       | 235016422      | 73                           | 73                        | Polü T (5), indel                         | 0,42        | 27459           | 0               | 136                | 99,5               |
| 17       | 3         | 4466229         | 4466321        | 93                           | 93                        | AT(3), indel                              | 0,27        | 34534           | 0               | 620                | 98,2               |
| 18       | 3         | 46620561        | 46620643       | 83                           | 83                        | Ei kohaldata                              | 0,43        | 31339           | 0               | 44                 | 99,9               |
| 19       | 3         | 49851331        | 49851400       | 70                           | 70                        | CT(3), indel                              | 0,49        | 26373           | 0               | 87                 | 99,7               |
| 20       | 3         | 189713161       | 189713248      | 88                           | 88                        | Polü A (5), Polü T (5), Polü A (9), TG(3) | 0,41        | 32829           | 0               | 857                | 97,5               |
| 21       | 3         | 190106030       | 190106104      | 75                           | 74                        | Indel                                     | 0,57        | 27925           | 0               | 47                 | 99,8               |
| 22       | 4         | 2233667         | 2233744        | 78                           | 78                        | Polü A (6)                                | 0,26        | 29327           | 4               | 162                | 99,4               |
| 23       | 4         | 7780541         | 7780637        | 97                           | 97                        | Polü G (6), Polü T (5), Polü A (5)        | 0,42        | 36585           | 0               | 117                | 99,7               |
| 24       | 4         | 15688604        | 15688681       | 78                           | 78                        | Ei kohaldata                              | 0,29        | 29427           | 0               | 57                 | 99,8               |
| 25       | 4         | 56236521        | 56236586       | 66                           | 62                        | Polü A (5), indel                         | 0,36        | 23356           | 5               | 75                 | 99,7               |
| 26       | 4         | 102839244       | 102839314      | 71                           | 69                        | Polü A (5)                                | 0,46        | 25942           | 0               | 140                | 99,5               |
| 27       | 4         | 164446743       | 164446804      | 62                           | 62                        | Polü A (7), indel                         | 0,27        | 22944           | 0               | 560                | 97,6               |
| 28       | 5         | 1882081         | 1882158        | 78                           | 75                        | Ei kohaldata                              | 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                        | Ei kohaldata                              | 0,39        | 24120           | 0               | 72                 | 99,7               |
| 31       | 5         | 74077114        | 74077196       | 83                           | 83                        | Polü A (6), indel                         | 0,3         | 31297           | 0               | 77                 | 99,8               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu       | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 32       | 5         | 147475343       | 147475409      | 67                           | 67                        | Polü T (5)                    | 0,37        | 25277           | 0               | 55                 | 99,8               |
| 33       | 5         | 149323731       | 149323821      | 91                           | 91                        | CT(4), AG (3)                 | 0,55        | 34308           | 0               | 90                 | 99,7               |
| 34       | 5         | 155662213       | 155662287      | 75                           | 75                        | Indel                         | 0,43        | 28266           | 0               | 163                | 99,4               |
| 35       | 6         | 6318713         | 6318814        | 102                          | 102                       | Polü G (6)                    | 0,68        | 38489           | 0               | 67                 | 99,8               |
| 36       | 6         | 24949983        | 24950074       | 92                           | 92                        | Indel                         | 0,63        | 34730           | 0               | 46                 | 99,9               |
| 37       | 6         | 31084900        | 31084999       | 100                          | 94                        | GCT(5), indel                 | 0,61        | 35057           | 0               | 483                | 98,6               |
| 38       | 6         | 32147987        | 32148084       | 98                           | 98                        | Polü T (5), TCT(3), CTT(3)    | 0,55        | 36647           | 0               | 406                | 98,9               |
| 39       | 6         | 32986864        | 32986958       | 95                           | 95                        | Indel                         | 0,53        | 35681           | 0               | 238                | 99,3               |
| 40       | 6         | 33408498        | 33408583       | 86                           | 86                        | Polü C (6)                    | 0,7         | 32438           | 0               | 70                 | 99,8               |
| 41       | 6         | 41647401        | 41647495       | 95                           | 94                        | Polü G (5), indel             | 0,61        | 35441           | 0               | 91                 | 99,7               |
| 42       | 6         | 112435865       | 112435955      | 91                           | 91                        | Polü A (5)                    | 0,44        | 34354           | 0               | 44                 | 99,9               |
| 43       | 7         | 22202076        | 22202148       | 73                           | 73                        | Ei kohaldata                  | 0,44        | 27575           | 0               | 28                 | 99,9               |
| 44       | 7         | 66276100        | 66276187       | 88                           | 88                        | Indel                         | 0,35        | 33060           | 0               | 213                | 99,4               |
| 45       | 7         | 77365735        | 77365821       | 87                           | 87                        | Polü A (7), AG(4)             | 0,26        | 32423           | 0               | 489                | 98,5               |
| 46       | 7         | 110939946       | 110940030      | 85                           | 85                        | Indel                         | 0,38        | 32074           | 0               | 56                 | 99,8               |
| 47       | 7         | 128533468       | 128533557      | 90                           | 90                        | Polü G (5), indel             | 0,62        | 33791           | 0               | 281                | 99,2               |
| 48       | 7         | 149503875       | 149503965      | 91                           | 91                        | Polü G (6), Polü C (6), indel | 0,71        | 34316           | 0               | 82                 | 99,8               |
| 49       | 7         | 154404519       | 154404599      | 81                           | 66                        | Ei kohaldata                  | 0,31        | 24901           | 0               | 47                 | 99,8               |
| 50       | 7         | 156476507       | 156476599      | 93                           | 93                        | Indel                         | 0,35        | 35067           | 0               | 87                 | 99,8               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 51       | 8         | 1817312         | 1817394        | 83                           | 83                        | Ei kohaldata              | 0,42        | 31365           | 0               | 9                  | > 99,9             |
| 52       | 8         | 24811020        | 24811109       | 90                           | 89                        | Polü G (7), CTC(4), indel | 0,61        | 32781           | 0               | 890                | 97,4               |
| 53       | 8         | 76518625        | 76518691       | 67                           | 67                        | Indel                     | 0,3         | 25228           | 0               | 146                | 99,4               |
| 54       | 9         | 103054909       | 103055006      | 98                           | 98                        | Polü G (6)                | 0,67        | 36968           | 0               | 76                 | 99,8               |
| 55       | 9         | 105586150       | 105586214      | 65                           | 65                        | Indel                     | 0,32        | 24472           | 0               | 100                | 99,6               |
| 56       | 9         | 107620823       | 107620918      | 96                           | 96                        | Ei kohaldata              | 0,49        | 36203           | 0               | 85                 | 99,8               |
| 57       | 9         | 123769149       | 123769231      | 83                           | 83                        | AT(3)                     | 0,37        | 31329           | 0               | 45                 | 99,9               |
| 58       | 9         | 138995345       | 138995441      | 97                           | 97                        | Polü C (6), indel         | 0,68        | 36472           | 0               | 201                | 99,5               |
| 59       | 10        | 5987120         | 5987198        | 79                           | 78                        | Polü G (5), indel         | 0,47        | 29473           | 0               | 11                 | > 99,9             |
| 60       | 10        | 11784629        | 11784726       | 98                           | 91                        | GC(3)                     | 0,87        | 34188           | 0               | 213                | 99,4               |
| 61       | 10        | 27317777        | 27317855       | 79                           | 79                        | Polü T (5)                | 0,3         | 29843           | 0               | 19                 | 99,9               |
| 62       | 10        | 33018351        | 33018440       | 90                           | 90                        | Polü A (5), Polü T (5)    | 0,2         | 33968           | 0               | 68                 | 99,8               |
| 63       | 10        | 45084159        | 45084253       | 95                           | 95                        | Indel                     | 0,35        | 35829           | 0               | 81                 | 99,8               |
| 64       | 10        | 55892599        | 55892687       | 89                           | 88                        | AC(11), indel             | 0,42        | 32098           | 88              | 2048               | 93,8               |
| 65       | 10        | 101611250       | 101611329      | 80                           | 80                        | Ei kohaldata              | 0,49        | 30217           | 0               | 28                 | 99,9               |
| 66       | 10        | 118351373       | 118351453      | 81                           | 81                        | Ei kohaldata              | 0,51        | 30531           | 0               | 96                 | 99,7               |
| 67       | 11        | 8159816         | 8159912        | 97                           | 96                        | Ei kohaldata              | 0,45        | 36105           | 0               | 192                | 99,5               |
| 68       | 11        | 30177648        | 30177717       | 70                           | 70                        | Indel                     | 0,46        | 26318           | 0               | 153                | 99,4               |



| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                   | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|---|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 69       | 11        | 47470345        | 47470444       | 100                          | 100                       | Ei kohaldata                              | 0,65        | 37785           | 0               | 24                 | 99,9               |
| 70       | 11        | 59837679        | 59837740       | 62                           | 62                        | Indel                                     | 0,37        | 23368           | 0               | 68                 | 99,7               |
| 71       | 11        | 64418856        | 64418957       | 102                          | 102                       | Ei kohaldata                              | 0,59        | 38546           | 0               | 10                 | > 99,9             |
| 72       | 11        | 93529612        | 93529684       | 73                           | 73                        | Polü A (5)                                | 0,4         | 27516           | 0               | 78                 | 99,7               |
| 73       | 11        | 101347052       | 101347136      | 85                           | 85                        | Ei kohaldata                              | 0,42        | 32083           | 0               | 48                 | 99,9               |
| 74       | 11        | 102477336       | 102477426      | 91                           | 91                        | Polü G (6)                                | 0,55        | 34047           | 0               | 369                | 98,9               |
| 75       | 11        | 118406285       | 118406369      | 85                           | 85                        | Indel                                     | 0,53        | 32065           | 0               | 74                 | 99,8               |
| 76       | 11        | 120357801       | 120357885      | 85                           | 85                        | Polü A (5), CA(3), indel                  | 0,34        | 32083           | 0               | 47                 | 99,9               |
| 77       | 11        | 125769313       | 125769397      | 85                           | 85                        | GA(3)                                     | 0,52        | 32103           | 0               | 27                 | 99,9               |
| 78       | 12        | 2834770         | 2834853        | 84                           | 84                        | Polü C (5), indel                         | 0,52        | 31645           | 16              | 525                | 98,3               |
| 79       | 12        | 26811004        | 26811096       | 93                           | 93                        | Polü A (7), AC(4)                         | 0,33        | 34824           | 0               | 330                | 99,1               |
| 80       | 12        | 30881766        | 30881846       | 81                           | 81                        | Ei kohaldata                              | 0,49        | 30497           | 0               | 121                | 99,6               |
| 81       | 12        | 88474105        | 88474175       | 71                           | 71                        | Polü A (6)                                | 0,35        | 26773           | 0               | 65                 | 99,8               |
| 82       | 12        | 120966872       | 120966966      | 95                           | 95                        | Polü G (5)                                | 0,68        | 35830           | 9               | 72                 | 99,8               |
| 83       | 13        | 24167504        | 24167576       | 73                           | 73                        | Ei kohaldata                              | 0,52        | 27498           | 0               | 114                | 99,6               |
| 84       | 13        | 25816961        | 25817049       | 89                           | 88                        | Polü A (5), Polü T (7), Polü A (7), indel | 0,22        | 32824           | 0               | 566                | 98,3               |
| 85       | 13        | 44880112        | 44880200       | 89                           | 89                        | Indel                                     | 0,49        | 33574           | 0               | 77                 | 99,8               |
| 86       | 13        | 77665218        | 77665294       | 77                           | 77                        | Indel                                     | 0,39        | 29075           | 0               | 31                 | 99,9               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 87       | 14        | 31619327        | 31619393       | 67                           | 67                        | GA(3), TA (3)           | 0,39        | 25313           | 0               | 13                 | 99,9               |
| 88       | 14        | 39517884        | 39517966       | 83                           | 83                        | Ei kohaldata            | 0,25        | 31360           | 0               | 22                 | 99,9               |
| 89       | 14        | 46958962        | 46959034       | 73                           | 72                        | Polü T (5), indel       | 0,19        | 26499           | 0               | 717                | 97,4               |
| 90       | 14        | 58050030        | 58050110       | 81                           | 81                        | Indel                   | 0,38        | 30494           | 0               | 133                | 99,6               |
| 91       | 14        | 82390559        | 82390649       | 91                           | 91                        | Indel                   | 0,35        | 34313           | 0               | 86                 | 99,7               |
| 92       | 14        | 92549544        | 92549609       | 66                           | 66                        | Polü A (5)              | 0,41        | 24555           | 0               | 1527               | 94,1               |
| 93       | 14        | 102808496       | 102808589      | 94                           | 94                        | Indel                   | 0,62        | 35472           | 0               | 69                 | 99,8               |
| 94       | 15        | 43170751        | 43170848       | 98                           | 96                        | Polü C (5)              | 0,45        | 36264           | 0               | 24                 | 99,9               |
| 95       | 15        | 63446149        | 63446216       | 68                           | 68                        | Indel                   | 0,25        | 25667           | 0               | 37                 | 99,9               |
| 96       | 15        | 77879807        | 77879901       | 95                           | 93                        | Polü G (5), indel       | 0,68        | 34745           | 0               | 432                | 98,8               |
| 97       | 15        | 81625334        | 81625428       | 95                           | 95                        | Polü T (6)              | 0,43        | 35870           | 0               | 40                 | 99,9               |
| 98       | 15        | 85438263        | 85438334       | 72                           | 71                        | Indel                   | 0,65        | 26762           | 0               | 76                 | 99,7               |
| 99       | 15        | 89817413        | 89817503       | 91                           | 91                        | Ei kohaldata            | 0,36        | 34286           | 0               | 112                | 99,7               |
| 100      | 15        | 89864274        | 89864343       | 70                           | 70                        | Indel                   | 0,56        | 26449           | 0               | 11                 | > 99,9             |
| 101      | 16        | 1894910         | 1894972        | 63                           | 63                        | Ei kohaldata            | 0,27        | 23809           | 0               | 5                  | > 99,9             |
| 102      | 16        | 28997904        | 28997998       | 95                           | 95                        | Polü 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                       | Polü C (5)              | 0,67        | 39177           | 0               | 144                | 99,6               |
| 105      | 16        | 85706375        | 85706465       | 91                           | 91                        | Polü T (5), indel       | 0,37        | 34075           | 0               | 323                | 99,1               |
| 106      | 17        | 3563920         | 3564008        | 89                           | 89                        | GC(3)                   | 0,64        | 33632           | 0               | 11                 | > 99,9             |
| 107      | 17        | 3594191         | 3594277        | 87                           | 87                        | Polü C (5), indel       | 0,67        | 32752           | 0               | 134                | 99,6               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu                | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|--|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 108      | 17        | 3970090         | 3970180        | 91                           | 91                        | Indel                                  | 0,46        | 34343           | 0               | 82                 | 99,8               |
| 109      | 17        | 16084945        | 16085037       | 93                           | 93                        | Indel                                  | 0,26        | 35077           | 0               | 78                 | 99,8               |
| 110      | 17        | 33998759        | 33998849       | 91                           | 89                        | Polü T (5)                             | 0,54        | 33553           | 0               | 89                 | 99,7               |
| 111      | 17        | 39589691        | 39589774       | 84                           | 82                        | Polü A (13), indel (x2)                | 0,29        | 30554           | 53              | 2296               | 92,9               |
| 112      | 17        | 41244394        | 41244484       | 91                           | 91                        | Polü A (5)                             | 0,34        | 34360           | 0               | 38                 | 99,9               |
| 113      | 17        | 45438866        | 45438957       | 92                           | 92                        | Polü A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel | 0,26        | 34367           | 0               | 418                | 98,8               |
| 114      | 17        | 61502432        | 61502510       | 79                           | 79                        | Indel                                  | 0,41        | 29751           | 0               | 119                | 99,6               |
| 115      | 17        | 64023582        | 64023667       | 86                           | 86                        | Polü 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                        | Ei kohaldata                           | 0,37        | 34386           | 0               | 12                 | > 99,9             |
| 119      | 18        | 9888026         | 9888094        | 69                           | 69                        | Polü A (6), TG(3)                      | 0,43        | 25692           | 0               | 399                | 98,5               |
| 120      | 18        | 38836999        | 38837073       | 75                           | 75                        | Polü A (5), indel                      | 0,37        | 27923           | 0               | 893                | 96,9               |
| 121      | 18        | 47405382        | 47405462       | 81                           | 81                        | CTC(3), indel                          | 0,47        | 30598           | 0               | 20                 | 99,9               |
| 122      | 18        | 54815665        | 54815749       | 85                           | 85                        | CT(3), indel                           | 0,45        | 31969           | 0               | 161                | 99,5               |
| 123      | 18        | 59773996        | 59774060       | 65                           | 65                        | Ei kohaldata                           | 0,48        | 24531           | 0               | 48                 | 99,8               |
| 124      | 19        | 625143          | 625241         | 99                           | 99                        | Ei kohaldata                           | 0,59        | 37298           | 0               | 124                | 99,7               |
| 125      | 19        | 18121418        | 18121491       | 74                           | 74                        | Ei kohaldata                           | 0,68        | 27881           | 0               | 109                | 99,6               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu  | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 126      | 19        | 18186574        | 18186643       | 70                           | 70                        | Ei kohaldata             | 0,64        | 26442           | 0               | 26                 | 99,9               |
| 127      | 20        | 746056          | 746149         | 94                           | 94                        | Ei kohaldata             | 0,61        | 35501           | 0               | 31                 | 99,9               |
| 128      | 20        | 10633195        | 10633276       | 82                           | 82                        | AC(3)                    | 0,59        | 30951           | 0               | 72                 | 99,8               |
| 129      | 20        | 17705633        | 17705708       | 76                           | 76                        | CT(3)                    | 0,58        | 28686           | 0               | 42                 | 99,9               |
| 130      | 20        | 21766821        | 21766890       | 70                           | 70                        | GT(3), TG (4), indel     | 0,46        | 26372           | 0               | 88                 | 99,7               |
| 131      | 20        | 25278421        | 25278521       | 101                          | 101                       | Indel                    | 0,63        | 38159           | 0               | 20                 | 99,9               |
| 132      | 20        | 50897302        | 50897368       | 67                           | 67                        | Indel                    | 0,36        | 25188           | 0               | 544                | 97,9               |
| 133      | 20        | 62331904        | 62331994       | 91                           | 88                        | Polü G (6)               | 0,73        | 32969           | 0               | 309                | 99,1               |
| 134      | 20        | 62690860        | 62690946       | 87                           | 87                        | Indel                    | 0,57        | 32818           | 0               | 77                 | 99,8               |
| 135      | 21        | 30300823        | 30300888       | 66                           | 66                        | Indel                    | 0,35        | 24758           | 9               | 181                | 99,2               |
| 136      | 21        | 33694176        | 33694273       | 98                           | 98                        | Polü T (6), CA(3)        | 0,54        | 36902           | 0               | 160                | 99,6               |
| 137      | 21        | 36710706        | 36710792       | 87                           | 87                        | GT(3), indel             | 0,39        | 32841           | 0               | 48                 | 99,9               |
| 138      | 21        | 46644924        | 46644992       | 69                           | 69                        | Polü A (6), AG(3), indel | 0,32        | 25939           | 0               | 280                | 98,9               |
| 139      | 21        | 46705575        | 46705664       | 90                           | 90                        | Polü T (5), Polü A (6)   | 0,5         | 33942           | 0               | 78                 | 99,8               |
| 140      | 22        | 25750774        | 25750873       | 100                          | 100                       | Indel                    | 0,63        | 37733           | 0               | 86                 | 99,8               |
| 141      | 22        | 32439233        | 32439329       | 97                           | 97                        | Ei kohaldata             | 0,68        | 36617           | 0               | 49                 | 99,9               |
| 142      | 22        | 37409844        | 37409940       | 97                           | 97                        | Indel                    | 0,46        | 36525           | 0               | 162                | 99,6               |
| 143      | 22        | 37637596        | 37637694       | 99                           | 99                        | Ei kohaldata             | 0,6         | 37398           | 0               | 24                 | 99,9               |
| 144      | 22        | 47081347        | 47081438       | 92                           | 92                        | Indel                    | 0,66        | 34754           | 0               | 22                 | 99,9               |
| 145      | X         | 15870424        | 15870492       | 69                           | 69                        | Polü T (5)               | 0,26        | 26046           | 0               | 36                 | 99,9               |

| Amplikon | Kromosoom | Amplikoni algus | Amplikoni lõpp | Analüüsitud fragmendi suurus | Usalduspiirkondade alused | Amplikoni genoomne sisu | GC sisaldus | Õiged nimetused | Valed nimetused | Puuduvad nimetused | Õigete nimetuste % |
|----------|-----------|-----------------|----------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 146      | X         | 135288543       | 135288611      | 69                           | 69                        | Polü C (5)              | 0,62        | 26019           | 0               | 63                 | 99,8               |
| 147      | X         | 135290777       | 135290847      | 71                           | 71                        | Ei kohaldata            | 0,52        | 26780           | 0               | 58                 | 99,8               |
| 148      | Y         | 2655397         | 2655461        | 65                           | 0                         | Ei kohaldata            | 0,55        | 0               | 0               | 0                  | Ei kohaldata       |
| 149      | Y         | 2655519         | 2655609        | 91                           | 0                         | Ei kohaldata            | 0,48        | 0               | 0               | 0                  | Ei kohaldata       |
| 150      | Y         | 2655609         | 2655679        | 71                           | 0                         | Polü A (5)              | 0,37        | 0               | 0               | 0                  | Ei kohaldata       |

Proovi GM12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (National Institutes of Standards and Technology, NIST; v.2.19). 150 amplikonist 92 sisaldasid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 41 amplikonil oli osaline kattuvus ja 17 amplikonil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 10 000 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on toodud **Tabelis 18**.

Tabelis 18 Proovi GM12878 somaatilise ühtivuse NIST andmebaasiga

| Proov   | Amplikonide arv | Keskmine nimetuse määr | TP   | VN | TN     | VP | PPA | NPA | OPA |
|---------|-----------------|------------------------|------|----|--------|----|-----|-----|-----|
| GM12878 | 133             | 98,8                   | 2808 | 0  | 258488 | 0  | 100 | 100 | 100 |

Selle üheksa käitusega somaatilise uuringu andmete põhjal saab seadmega NextSeq 550Dx järjekindlalt sekveneerida järgmist.

- ▶ GC sisaldus  $\geq 19\%$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 19% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 2,6%)
- ▶ GC sisaldus  $\leq 87\%$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 87% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,6%)
- ▶ PolüA pikkused  $\leq 9$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 9-nukleotiidset PolüA kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 2,5%)
- ▶ PolüT pikkused  $\leq 10$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 10-nukleotiidset PolüT kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli väiksem kui 0,1%)
- ▶ PolüG pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 2268 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüG kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- ▶ PolüC pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 756 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüC kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,4%)
- ▶ Dinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 4x$  (kõik nimetatud alused 1890 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 4x dinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,9%)
- ▶ Trinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 5x$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 5x trinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,4%)
- ▶ Insertiooni pikkused  $\leq 23$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 23-nukleotiidset insertiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,8%)
- ▶ Deletsiooni pikkused  $\leq 25$  (kõik nimetatud alused 1134 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 25-nukleotiidset deletsiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,7%)

## Kordustäpsus

Seadme NextSeq 550Dx kordustäpsus määrati, analüüsid 13 kordumatut platinagenoomi proovi, kasutades kolme seadet, kolme reaktiivikomplekti ja kolme operaatorit, et luua viie päeva jooksul üheksa sekveneerimiskäitust. Näitlik analüüs, proovid ja referentsmeetod on samad kui need, mida on kirjeldatud idutee täpsusuuringu jaoks. Kordustäpsuse panused määrati varieeruvuskomponendi analüüsiga, kasutades VAF-i vastuse muutujana ja arvutades standardhälbed komponendi tasemel seadme, reaktiivipartii, operaatori ja päeva kohta (**Tabelis 19**). Seadme, operaatori või reaktiivikomplekti varieeruvuse iga komponendi kohta analüüsis kasutatavate vaatluste koguarv oli SNV-de, insertioonide ja deletsioonide korral vastavalt 699, 176 ja 235.

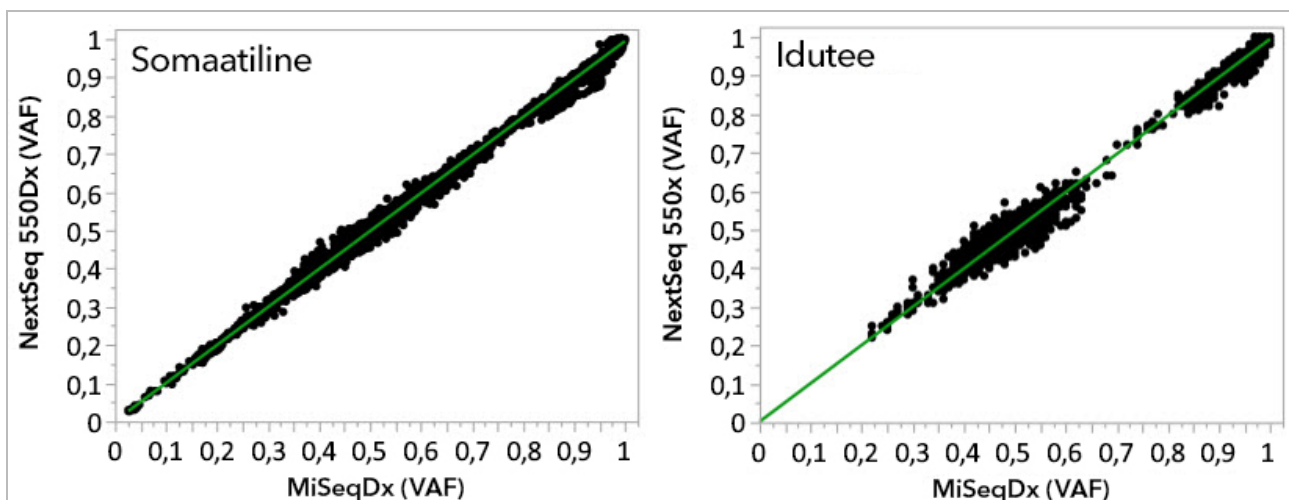
Tabelis 19 Kordustäpsuse tulemused seadme NextSeq 550Dx kohta (standardhälve)

| Komponent | Variandi tüüp | Komponendi SD |         | SD kokku |         |
|-----------|---------------|---------------|---------|----------|---------|
|           |               | Max           | Mediaan | Max      | Mediaan |
| Partii    | SNV           | 0,0076        | 0,0002  | 0,0833   | 0,0154  |
|           | Insertsioon   | 0,0104        | 0,0000  | 0,0410   | 0,0157  |
|           | Deletsioon    | 0,0046        | 0,0005  | 0,0560   | 0,0187  |
| Seade     | SNV           | 0,0114        | 0,0003  | 0,0840   | 0,0153  |
|           | Insertsioon   | 0,0138        | 0,0009  | 0,0407   | 0,0161  |
|           | Deletsioon    | 0,0079        | 0,0008  | 0,0549   | 0,0187  |
| Operaator | SNV           | 0,0226        | 0,0008  | 0,0841   | 0,0155  |
|           | Insertsioon   | 0,0344        | 0,0010  | 0,0417   | 0,0164  |
|           | Deletsioon    | 0,0083        | 0,0013  | 0,0547   | 0,0187  |
| Päev      | SNV           | 0,0277        | 0,0012  | 0,0825   | 0,0160  |
|           | Insertsioon   | 0,0235        | 0,0012  | 0,0409   | 0,0169  |
|           | Deletsioon    | 0,0271        | 0,0014  | 0,0548   | 0,0188  |

### Meetodi võrdlus (sekveneerimisplatvorm)

Täisvere- ja FFPE-proove hinnati seadmetes NextSeq 550Dx ja MiSeqDx, kasutades seadme TruSeq kohandatud ampliconi komplekti Dx idutee ja somaatilist töövoogu. Vere- ja FFPE-proovide variandi sageduse ühtivust hinnati mitme näitliku analüüsiga. **Joonis 2** kujutab VAF-i korrelatsiooni kahe seadme vahel ühe näitliku analüüsi kohta ja **Tabelis 20** on see korrelatsioon kokku võetud analüüsipaneeli järgi. Seadmete MiSeqDx ja NextSeq 550Dx vahelise tugeva korrelatsiooni põhjal määratakse, et eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajad (nt eraldamismeetodid või segavad ained) kehtivad mõlemale seadmele. Lisateavet vaadake seadme TruSeq kohandatud ampliconi komplekti Dx pakendi teabelehest.

Joonis 2 Seadmete MiSeqDx ja NextSeq 550Dx vaheline VAF-i korrelatsioon FFPE- (vasakul) ja vereproovide (paremal) korral, kasutades analüüsi 1



Tabelis 20 Meetodi võrdluse tulemused, kasutades kordumatuid vere- ja FFPE-proove

| gDNA allikas | Analüüs (oligokogum) | Bioloogilised replikaadid (proovid) | Tehnilised replikaadid (proovi kohta) | Vaatlused (variantide arv) | Kalle | Lõikepunkt | Korrelatsioon (R <sup>2</sup> ) |
|--------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------|------------|---------------------------------|
| Veri         | Analüüs 1            | 45                                  | 2                                     | 8369 <sup>1</sup>          | 0,992 | 0,002      | 0,995 <sup>2</sup>              |
| Veri         | Analüüs 2            | 45                                  | 2                                     | 5457                       | 0,995 | 0,005      | 0,981                           |
| FFPE         | Analüüs 1            | 46                                  | 2                                     | 8319                       | 0,993 | 0,000      | 0,997 <sup>2</sup>              |
| FFPE         | Analüüs 3            | 40                                  | 1                                     | 280                        | 0,969 | 0,015      | 0,978                           |

<sup>1</sup> Kaks andmepunkti eemaldati idutee variandi mooduli jaoks kehtestatud piirangu põhjal.

<sup>2</sup> VAF-i diagrammide määramiskoeffitsient joonisel 2 näidatud kujul.

## Korratavus

Seadme NextSeq 550Dx korratavust hinnati platinagenoomi proovidega näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses 23 eri kromosoomis, kasutades 150 amplikoni. Idutee analüüs sisaldas 13 proovi seitset replikaati; somaatiline analüüs sisaldas seitsme proovi kuut replikaati VAF-i eri tasemetel. Proove võrreldi seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplektiga Dx.

Analüüs tehti kolmes välises kohas, kasutades üht seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) partiid. Igas kohas kasutati üht seadet NextSeq 550Dx. Igas kohas viis analüüsi läbi kaks operaatorit. Iga operaator tegi analüüsi kolmel mittejärjestikusel päeval iga proovi tüübiga, kolmes kohas kokku 36 käitust. Analüüs andis tulemuseks 18 käitust iga idutee ja somaatilise töövoa käituse kohta.

### Idutee

Idutee variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$ , esitatakse positiivsetena (variant). Eeldatavate positiivsete idutee variantide korral hinnati andmeid nimetuste puudumiste määra ja õigete positiivsete nimetuste määra suhtes igas variandi tüübis (SNV, insertioon, deletsioon). Tabelis 21 on kokku võetud vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

Tabelis 21 Eeldatavate positiivsete tulemuste idutee nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi

| Variandi tüüp | Puuduv nimetus |         |          | Õige positiivne nimetus |         |          |         |         |
|---------------|----------------|---------|----------|-------------------------|---------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud      | Kokku   | Protsent | Vaadeldud               | Kokku   | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| SNV           | 16             | 110 376 | 0,014    | 110 349                 | 110 360 | 99,99    | 99,98   | 99,99   |
| Insertioonid  | 1026           | 37 044  | 2,77     | 36 018                  | 36 018  | 100      | 99,99   | 100,00  |
| Deletsioonid  | 648            | 34 776  | 1,86     | 34 128                  | 34 128  | 100      | 99,99   | 100,00  |

Idutee variandid, mille VAF-tase on  $< 0,2$ , esitatakse negatiivsetena (metsiktüüp). Eeldatavate negatiivsete idutee asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumiste ja õigete metsiktüüpi nimetuste määrade suhtes. Tabelis 22 on kokku võetud vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodit kasutades.

Tabelis 22 Eeldatavate negatiivsete tulemuste idutee nimetuse vaatlused

| Variandi tüüp | Puuduv nimetus |            |          | Õige negatiivne nimetus |            |          |         |         |
|---------------|----------------|------------|----------|-------------------------|------------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud      | Kokku      | Protsent | Vaadeldud               | Kokku      | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| Metsiktüüpi   | 4883           | 19 600 182 | 0,025    | 19 595 299              | 19 595 299 | 100      | 100,00  | 100,00  |



Idutee variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks heterosügootiks, ja variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks homosügootiks. Heterosügootsete variantidega idutee proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust. Cx määrati mõlema piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli Cx  $\geq 99,999\%$ , mis näitab, et  $\geq 99,999\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF korral oli Cx  $\leq 0,001\%$ , mis näitab, et  $\leq 0,001\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. **Tabelis 23** on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi.

Idutee variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks heterosügootiks, ja variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks homosügootiks. Heterosügootsete variantidega idutee proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust. Cx määrati mõlema piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli Cx  $\geq 99,999\%$ , mis näitab, et  $\geq 99,999\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF suhtes oli Cx  $\leq 0,001\%$ , mis näitab, et  $\leq 0,001\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. **Tabelis 23** on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi.

Tabelis 23 Heterosügootsete variantide idutee Cx-i väärtused

| Variandi tüüp | Piirväärtus 0,2 VAF | Piirväärtus 0,7 VAF |
|---------------|---------------------|---------------------|
|               | $\geq C99,999\%$    | $\leq C0,001\%$     |
| SNV           | 94/94               | 94/94               |
| Insertsioonid | 24/24               | 24/24               |
| Deletsioonid  | 35/35               | 35/35               |
| Kokku         | 153                 | 153                 |

#### Somaatiline

Somaatilised variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,026$ , esitatakse positiivsetena (variant). Vaatlused, mille VAF-tase oli  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ , peeti selle analüüsi suhtes ebamäärasteks (ei ole positiivsed ega negatiivsed, märgitud madala sagedusega variantideks). Toimivuse hindamiseks arvutati tulemused kolmel viisil.

- ▶ Parim olukord: kõik ebamäärased tulemused loeti õigeks positiivseks nimetuseks (ühtivus eeldatavate tulemustega)
- ▶ Halvim olukord: kõik ebamäärased tulemused loeti valeks nimetuseks (vastuolu eeldatavate tulemustega)
- ▶ Välistamine: kõik ebamäärased tulemused välistati analüüsist

Kolmes tabelis, **Tabelis 24**, **Tabelis 25** ja **Tabelis 26**, on kokku võetud nimetuste tulemused vastavalt prima olukorra, halvima olukorra ja välistamise kohta koos Wilsoni skoori meetodiga arvatud alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL).

Tabelis 24 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (parim olukord)

| Variandi tüüp | Õige positiivne nimetus |        |          |         |         |
|---------------|-------------------------|--------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud               | Kokku  | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| SNV           | 54 346                  | 54 346 | 100      | 99,99   | 100,00  |
| Insertsioonid | 18 036                  | 18 036 | 100      | 99,98   | 100,00  |
| Deletsioonid  | 18 381                  | 18 381 | 100      | 99,98   | 100,00  |

Tabelis 25 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (halvim olukord)

| Variandi tüüp | Õige positiivne nimetus |        |          |         |         |
|---------------|-------------------------|--------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud               | Kokku  | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| SNV           | 54 346                  | 54 346 | 100      | 99,99   | 100,00  |
| Insertsioonid | 18 000                  | 18 036 | 99,8     | 99,72   | 99,86   |
| Deletsioonid  | 18 381                  | 18 381 | 100      | 99,98   | 100,00  |

Tabelis 26 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (ebamäärased nimetused on eemaldatud)

| Variandi tüüp | Õige positiivne nimetus |        |          |         |         |
|---------------|-------------------------|--------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud               | Kokku  | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| SNV           | 54 346                  | 54 346 | 100      | 99,99   | 100,00  |
| Insertsioonid | 18 000                  | 18 000 | 100      | 99,98   | 100,00  |
| Deletsioonid  | 18 381                  | 18 381 | 100      | 99,98   | 100,00  |

Somaatilised variandid, mille VAF-tase on  $< 0,01$ , esitatakse negatiivsetena (metsiktüüp). Eeldatavate negatiivsete somaatiliste asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumise määra ja õigete metsiktüüpi nimetuste määra suhtes. Õiged metsiktüüpi nimetused määrati, välistades nimetuse puudumised ja arvates maha vaadeldud nimetused, mis jäid ebamäärasesse tsooni (VAF-tasemed  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ ), ning valed nimetused, mis jäid koguväärtuse piirväärtusest kõrgemale (VAF-tasemed  $\geq 0,026$ ). Tabelis 27 on kokku võetud vaadeldud tulemused, kogutulemused ja protsendid negatiivsete somaatiliste asukohtade nimetuste puudumise määra kohta ja õigete metsiktüüpi nimetuste määra kohta koos ülemise ja alumise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodiga.

Tabelis 27 Eeldatavate negatiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused

| Variandi tüüp | Puuduv nimetus |           |          | Õige nimetus |      |           |           |          |         |         |
|---------------|----------------|-----------|----------|--------------|------|-----------|-----------|----------|---------|---------|
|               | Vaadeldud      | Kokku     | Protsent | Ebamäärane   | Vale | Õige      | Kokku     | Protsent | 95% LCL | 95% UCL |
| Metsiktüüpi   | 36 326         | 8 909 676 | 0,408    | 2254         | 121  | 8 870 975 | 8 873 350 | 99,97    | 99,972  | 99,974  |

Analüüsi C95 määramiseks arvutati sama variandi kohta somaatilised proovid VAF-i eri tasemetel (iga variandi tüübi sees). Varieeruvuse hindamiseks analüüsi piirväärtuse lähedal kasutati proove, mille eeldatav VAF-tase oli vahemikus 0,02 kuni 0,07. C95 määrati iga variandi kohta, iga variandi tüübi kõrgeim C95 on toodud Tabelis 28.

Tabelis 28 Somaatilise C95 kokkuvõte

| Variandi tüüp | N  | C95    |
|---------------|----|--------|
| SNV           | 74 | 0,0613 |
| Insertsioon   | 24 | 0,0573 |
| Deletsioon    | 33 | 0,0575 |

## Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) toimivus

### Ülevaade

Seadet NextSeq 550Dx toetavad kaks reaktiivikomplekti: seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2 (300 tsükli) ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2.5 (300 tsükli). Selleks et näidata, et seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2.5 (300 tsükli) vastab seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) jaoks kontrollitud ja kinnitatud analüüsi tehnilistele nõudmistele, viidi läbi uuringud seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli). Tehti kaks teegi ettevalmistust, kasutades seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx, üks idutee töövooga ja teine somaatilise töövooga. Iga töövoote teeke analüüsiti seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) kolme partiiga, kasutades kolme seadet NextSeq 550Dx. Peale selle sisaldas iga töövoote analüüs üht käitust seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli).

### Analüütiline tundlikkus (kriitiline väärtus (LoB) ja avastamispiir (LoD))

Kontroll seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) näitas, et seade NextSeq 550Dx suudab tuvastada variante väärtuse 0,05 VAF juures II tüüpi veaga  $\leq 0,05$  ja et somaatilise variandi mooduliga kasutatav piirväärtus 0,026 VAF (tegelik LoB) toetab I tüüpi viga  $\leq 0,01$ . Nende väidete põhjal võib eeldada, et variant tasemel 0,05 VAF on suurem kui 0,026 VAF või sellega võrdne 95%-l ajast ja et metsiktüüpi positsioon on väiksem kui 0,026 VAF 99%-l ajast. Tagamaks, et need väited saavad kinnitust ka seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli), viidi läbi kordusmõõtmised seadmega NextSeq 550Dx metsiktüüpi proovidega (LoB proovid) ja proovidega, mis sisaldasid variante tasemel 0,05 VAF (LoD proovid), kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli). Seejärel võrreldi piirväärtusest 0,026 üleval- ja allpool olevate nimetuste osakaalu väidetega, mis saadi seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli).

Analüüs sisaldas kaht LoD proovi, kummalgi kordumatu variantide komplekt sihiga väärtusele 0,05 VAF, ja vastavaid LoB proove, mis olid sihtvariantide suhtes metsiktüüpi. Teegi ettevalmistamiseks töödeldi LoD ja LoB proove vastavalt kaheksa ja seitsme replikaadi kaupa, kasutades seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx. Teeke sekveneeriti algselt seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli), et tuvastada variantid/genoomikoordinaadid LoB/LoD hindamiseks seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli). Kõiki variante, mille keskmine VAF oli seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) tulemuste põhjal vahemikus 0,045–0,055 (LoD variandid), kasutati LoD analüüsiks (N = 51 varianti). LoB analüüsiks hinnati 51 vastavat genoomikoordinaati.

Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) hindamiseks sekveneeriti teeke kolmes käituses kolme järjestikuse päeva jooksul, kasutades sama seadet ja reaktiivikomplekti partiid. See analüüsimine andis kokku 24 replikaati igale 51 LoD variandile ja 21 replikaati igale vastavale metsiktüüpi positsioonile. Väärtusega VAF < 0,026 metsiktüüpi nimetuste osakaal on toodud [Tabelis 29](#). VAF-iga 0,026 või sellest suurema väärtusega LoD variandi nimetuste osakaal on toodud [Tabelis 30](#).

Tabelis 29 Väärtusega < 0,026 metsiktüüpi positsioonide osakaal (LoB väite hindamine)

| Variandi tüüp | Hinnatud positsioonid | Vaatlusi kokku | VAF-mõõtmiste arv<br>$\geq 2,6\%$ | Osakaal<br>< 2,6% | Osakaal 95%<br>Usaldusvahemik |
|---------------|-----------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| SNV           | 32                    | 672            | 0                                 | 1                 | 0,994–1                       |
| Insertsioon   | 11                    | 231            | 0                                 | 1                 | 0,984–1                       |
| Deletsioon    | 8                     | 168            | 0                                 | 1                 | 0,978–1                       |

Tabelis 30 Väärtusega  $\geq 0,026$  VAF LoD variantide osakaal (LoD väite hindamine)

| Variandi tüüp | Hinnatud positsioonid | Vaatlusi kokku | VAF-mõõtmiste arv < 2,6% | VAF-mõõtmiste arv $\geq 2,6\%$ | Osakaal $\geq 2,6\%$ | Osakaal 95% Usaldusvahemik |
|---------------|-----------------------|----------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------|
| SNV           | 32                    | 768            | 1                        | 767                            | 0,999                | 0,993–1                    |
| Insertsioon   | 11                    | 264            | 3                        | 261                            | 0,989                | 0,967–0,996                |
| Deletsioon    | 8                     | 192            | 2                        | 190                            | 0,99                 | 0,963–0,997                |

## Täpsus

### Idutee

Järgmine uuring viidi läbi, et hinnata variandi nimetuse täpsust idutee variandi mooduliga, kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli). Näitlikku analüüsi kasutades analüüsiti 12 kordumatut platinagenoomi proovi. Kokku tehti 11 käitust kolme seadmega NextSeq 550Dx ja kolme seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli).

Täpsus määrati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, platinagenoomide versiooniga 2016-1.0. Viiteks on toodud täpsuse tulemused ühest sekveneerimiskäitusest seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli). Tulemuste kokkuvõte on toodud [Tabelis 31](#).

Tabelis 31 Idutee ühtivuse kokkuvõte

| Kriteeriumid       | Vaatlusi kokku (v2.5) <sup>1</sup> | Tulemus vaatluse järgi (v2.5) <sup>2</sup> | Tulemus vaatluse järgi (v2) <sup>3</sup> | Tulemus käituse järgi (v2.5) <sup>4</sup> | Tulemus käituse järgi (v2) <sup>4</sup> |
|--------------------|------------------------------------|--|--|---|---|
| SNV PPA            | 1056                               | 98,7                                       | 98,7                                     | > 99,9                                    | > 99,9                                  |
| Insertsioonide PPA | 1056                               | 100  | 100                                      | 100                                       | 98,9                                    |
| Deletsioonide PPA  | 1056                               | 95,2                                       | 95,2                                     | > 99,9                                    | 100                                     |
| NPA                | 1056                               | 100  | 100                                      | 100                                       | 100                                     |
| OPA                | 1056                               | > 99,9                                     | > 99,9                                   | > 99,9                                    | > 99,9                                  |

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta  $\times$  käituste arv (96 proovi käituse kohta  $\times$  11 käitust = 1056 vaatlust).

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõikides käitustes (11 käituse põhjal seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5).

<sup>3</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta ühes käituses (kokku 96 vaatlust).

<sup>4</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

### Somaatiline

Järgmine uuring viidi läbi somaatilise variandi mooduli variandi nimetamise täpsuse hindamiseks seadmes NextSeq 550Dx, kasutades seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli). Näitliku analüüsiga analüüsiti kümme platinagenoomi FFPE-proovi (kaks väärtusele 0,05 VAF lahjendatud variantidega). Kokku tehti 11 käitust kolme seadmega NextSeq 550Dx ja kolme seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) partiiga.

Täpsus määrati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, platinagenoomide versiooniga 2016-1.0. Viiteks on toodud täpsuse tulemused ühest sekveneerimiskäitusest seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli). Tulemuste kokkuvõte on toodud [Tabelis 32](#).

Tabelis 32 Somaatilise ühtivuse kokkuvõte

| Kriteeriumid       | Vaatlusi kokku (v2.5) <sup>1</sup> | Tulemus vaatluse järgi (v2.5) <sup>2</sup> | Tulemus vaatluse järgi (v2) <sup>3</sup> | Tulemus käituse järgi (v2.5) <sup>4</sup> | Tulemus käituse järgi (v2) <sup>4</sup> |
|--------------------|------------------------------------|--|--|---|---|
| SNV PPA            | 528                                | 100  | 100                                      | 100                                       | 100                                     |
| Insertsioonide PPA | 528                                | 96,9                                       | 96,9                                     | > 99,9                                    | > 99,9                                  |
| Deletsioonide PPA  | 528                                | 100  | 100                                      | 100                                       | 100                                     |
| NPA                | 528                                | > 99,9                                     | > 99,9                                   | > 99,9                                    | > 99,9                                  |
| OPA                | 528                                | > 99,9                                     | > 99,9                                   | > 99,9                                    | > 99,9                                  |

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta × käituste arv (48 proovi käituse kohta × 11 käitust = 528 vaatlust).

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõikides käitustes (11 käituse põhjal seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5).

<sup>3</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta ühes käituses (kokku 96 vaatlust).

<sup>4</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

## Kordustäpsus

### Idutee

Seadme NextSeq 550Dx suure väljundi reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) kordustäpsust idutee variandi mooduliga hinnati plaatinagenoomi proove ja näitlikku analüüsi kasutades. Analüüsimine koosnes ühest teegi ettevalmistusest, kasutades seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx, ja sisaldas 12 proovi, mida kõiki töödeldi kaheksa replikaadiga. Teeke sekveneeriti seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli) ja kolme seadmega NextSeq 550Dx, kokku üheksa sekveneerimiskäitust.

Heterosügootsete variantidega proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust (N = 153 kordumatut heterosügootset varianti). Cx määrati mõlema idutee variandi mooduli piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli seadme NextSeq 550Dx reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) minimaalse Cx-iga variandi tulemus > 99,9%, mis näitab, et > 99,9% heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF korral oli seadme NextSeq 550Dx reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) maksimaalse Cx-iga variandi tulemus < 1,5%, mis näitab, et ≤ 1,5% heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. Tabelis 33 on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi. Viiteks on toodud seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) ühe sekveneerimiskäitusega saadud Cx-i väärtused.

Tabelis 33 Heterosügootsete variantide idutee Cx-i väärtused

| Variandi tüüp | N  | Piirväärtus 0,2 VAF        |                          | Piirväärtus 0,7 VAF        |                          |
|---------------|----|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|               |    | Min Cx (v2.5) <sup>1</sup> | Min Cx (v2) <sup>2</sup> | Max Cx (v2.5) <sup>1</sup> | Max Cx (v2) <sup>2</sup> |
| SNV           | 94 | > 99,9%                    | > 99,9%                  | 1,5%                       | 1,0%                     |
| Insertsioonid | 24 | 100%                       | 100%                     | 0%                         | < 0,1%                   |
| Deletsioonid  | 35 | 100%                       | > 99,9%                  | < 0,1%                     | < 0,1%                   |

<sup>1</sup> Cx-i väärtused standardhälbe koguhinnangute põhjal varieeruvuskomponendi analüüsist.

<sup>2</sup> Cx-i väärtused näidisstandardhälvete põhjal.

## Somaatiline

Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) kordustäpsust somaatilise variandi mooduliga hinnati plaatinagenoomi FFPE-proove ja näitlikku analüüsi kasutades. Analüüsimine koosnes ühest teegi ettevalmistusest, kasutades seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx, ja sisaldas kaht proovi kaheksa replikaadiga. Teeke sekveneeriti seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) kolme partiiga ja kolme seadmega NextSeq 550Dx, kokku üheksa sekveneerimiskäitust.

Eeldatavate VAF-i tasemetega  $\leq 0,10$  VAF somaatilisi variante (N = 131 kordumatut varianti) kasutati seadme varieeruvuse hindamiseks somaatilise variandi mooduli VAF-i piirväärtuse lähedal (somaatilisi variante VAF-i tasemega  $\geq 0,026$  nimetatakse variandi suhtes positiivseteks). C95 väärtused määrati iga somaatilise variandi kohta. C95 väärtused esindavad VAF-i, mille puhul on 95% tõenäosus, et see on suurem kui somaatilise variandi mooduli VAF-i piirväärtus. Kõrgeimad C95 väärtused variandi tüübi järgi on toodud Tabelis 34.

Viiteks on toodud seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) ühe sekveneerimiskäitusega saadud C95 tulemused.

Tabelis 34 Somaatilise C95 kokkuvõte

| Variandi tüüp | Hinnatud variantide arv | C95 (v2.5) <sup>1</sup> | C95 (v2) <sup>2</sup> |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| SNV           | 74                      | 0,064                   | 0,063                 |
| Insertsioonid | 24                      | 0,062                   | 0,061                 |
| Deletsioonid  | 33                      | 0,060                   | 0,060                 |

<sup>1</sup> C95 väärtused standardhälbe koguhinnangute põhjal varieeruvuskomponendi analüüsist.

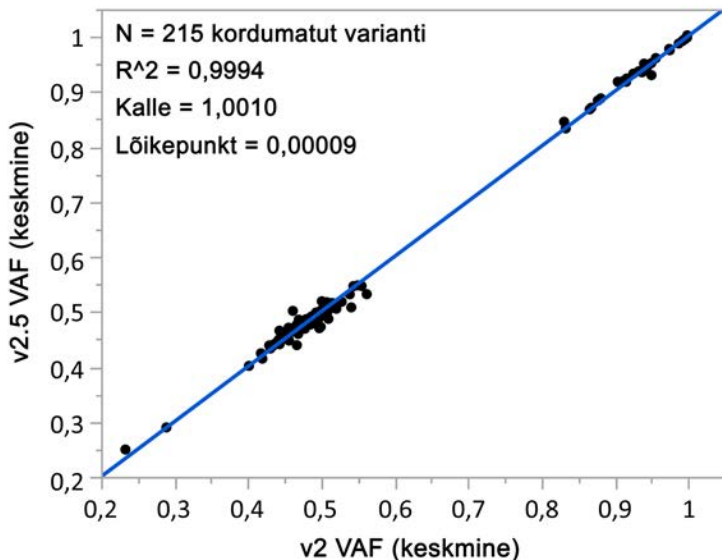
<sup>2</sup> C95 väärtused näidisstandardhälvete põhjal.

## Meetodi võrdlus (reaktiivikomplekt)

### Idutee

215 kordumatu variandi keskmisi VAF-väärtusi hinnati seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli), kasutades idutee variandi mooduliga saadud tulemusi. VAF-i keskmised arvutati 11 sekveneerimiskäitusest (v2.5) ja ühest sekveneerimiskäitusest (v2). Iga variandi keskmise arvutamiseks kasutati vähemalt kaheksat replikaati. Joonis 3 on kujutatud VAF-i korrelatsioon kahe reaktiivikomplekti vahel. Tugeva lineaarse VAF-i korrelatsiooni ja reaktiivikomplektide tulemuste sarnasuse põhjal määratakse, et seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) idutee variandi mooduliga algset kontrollitud ja kinnitatud toimivusnäitajad on rakendatavad seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektile v2.5 (300 tsükli).

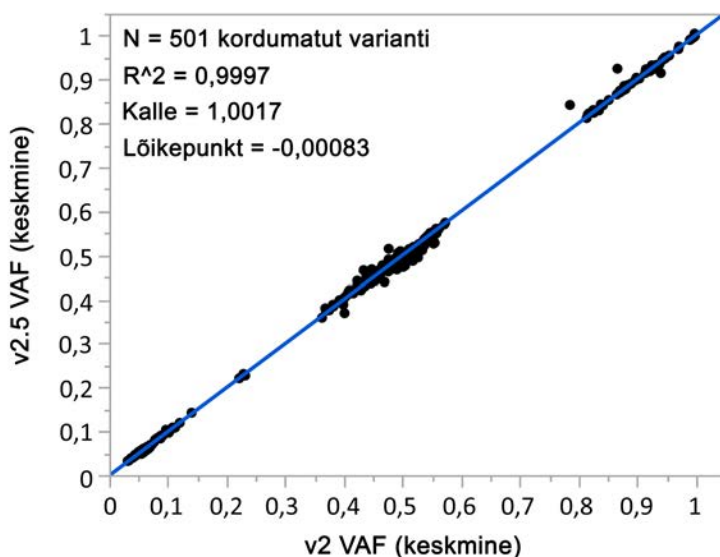
Joonis 3 Idutee variandi mooduli variantalleeli sageduse (VAF) korrelatsioon seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) vahel.



### Somaatiline

501 kordumatu variandi keskmisi VAF-väärtusi hinnati seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2.5 (300 tsükli), kasutades somaatilise variandi mooduliga saadud tulemusi. VAF-i keskmised arvutati 11 sekveneerimiskäitusest (v2.5) ja ühest sekveneerimiskäitusest (v2). Iga kordumatu variandi keskmise arvutamiseks kasutati vähemalt kolme replikaati. **Joonis 4** on kujutatud VAF-i korrelatsioon kahe reaktiivikomplekti vahel. VAF-i korrelatsiooni ja reaktiivikomplektide tulemuste sarnasuse põhjal määratakse, et seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektiga v2 (300 tsükli) somaatilise variandi mooduliga kontrollitud ja kinnitatud toimivusnäitajad on rakendatavad seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplektile v2.5 (300 tsükli).

Joonis 4 Somaatilise variandi mooduli variantalleeli sageduse (VAF) korrelatsioon seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2 (300 tsükli) ja seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekti v2.5 (300 tsükli) vahel.



## Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina”) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ega/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjaliselt, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

**SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE EGA ÜKSIKASJALIK JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA NING NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.**

**ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.**

© 2021 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).



## Kontaktteave



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+ 1 800 809 ILMN (4566)  
+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

**Sponsor Austraalias**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Austraalia

## Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiate, kui külastate aadressi [support.illumina.com](http://support.illumina.com) ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation and Literature* (Dokumendid ja kirjandus).