

# NextSeq™ 550Dx -laite

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN  
VAIN VIENTIIN

Luettelonro 20005715

## Käyttötarkoitus

NextSeq 550Dx -laite on tarkoitettu DNA-kirjastojen sekvensointiin, kun sitä käytetään *in vitro* -diagnostisten määritysten kanssa. NextSeq 550Dx -laitetta tulee käyttää erityisesti rekisteröityjen, sertifioitujen tai hyväksytyjen *in vitro* -diagnostisten reagenssien ja analyttisten ohjelmistojen kanssa.

## Menetelmän periaatteet

illumina NextSeq 550Dx -laite on tarkoitettu sekvensoimaan DNA-kirjastoja *in vitro* -diagnostisilla määrittäyksillä. Syöttöä varten NextSeq 550Dx käyttää DNA:sta luotuja kirjastoja, joihin näyteindeksit ja kaappaussekvenssit lisätään vahvistettuihin kohteisiin. Näytekirjastot kaapataan virtauskyvettiin ja sekvensoidaan instrumenttiin synteessin (SBS-kemian) avulla. SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää fluoresoivasti merkittyjen yksittäisten nukleotidipohjien toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-säikeisiin. Real-Time Analysis (reaaliaikainen analyysi, RTA) on ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatupisteytyksen kullekin emäkselle kussakin sekvensointijaksossa. Kun ensisijainen analyysi päättyy, toissijainen analyysi voidaan suorittaa laitteella emäksen tunnistusten prosessoimiseksi. NextSeq 550Dx käyttää erilaisia toissijaisia analyysimoduuleja työnkulun perusteella. Iturata- tai somaattisissa varianttimoduuleissa prosessointi sisältää demultipleksoinnin, FASTQ-tiedoston luonnin, kohdistuksen, variantin tunnistuksen sekä variantin tunnistusformaatin (VCF ja gVCF) tiedostojen luomisen. VCF- ja gVCF-tiedostot sisältävät tietoa viitegenomin tietyistä asemista löytyneistä varianteista.

## Kaksoiskäynnistyksen määrittäminen

NextSeq 550Dx sisältää kaksoiskäynnistyksen määrittäksen, jonka avulla laitetta voidaan käyttää vain diagnostisen (Dx) tai tutkimuskäytön (RUO) tilassa. *In vitro* -diagnostiset sekvensointimäärittäykset, mukaan lukien iturata- ja somaattiset varianttimoduulit, suoritetaan diagnostisessa tilassa. Diagnostisessa tilassa voidaan käyttää vain IVD-sekvensointireagensseja. NextSeq 550Dx -laitteen suorituskykyominaisuudet ja -rajoitukset on määritetty käyttämällä iturata- ja somaattisia varianttimoduuleja diagnostisessa tilassa.

## Menetelmän rajoitukset

- 1 *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- 2 Kun iturata- ja somaattisia varianttimoduuleja käytetään NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2 (300 jaksoa) tai NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) kanssa, ne kykenevät tuottamaan seuraavaa:
  - ▶ sekvensointikapasiteetti  $\geq 90$  gigaemästä (Gb)
  - ▶ Read-pituus (paired end -ajossa) 2 x 150 emäsparia (bp)
  - ▶ Emäkset, jotka ovat yhtäsuuria tai suurempia kuin  $Q30 \geq 75\%$  read-pituuden ollessa 2 x 150 bp  
Emäksillä, jotka ovat yhtä suuria tai suurempia kuin  $75\%$ , on Phred-asteikon laatupisteet  $\geq 30$ , mikä osoittaa yli 99,9 %:n emästunnistustarkkuutta

- 3 Indeleitä (insertiot, deleetiot tai yhdistelmät) sisältäviä readeja, joissa sisällön pituus on > 25 bp, ei kohdisteta määrittysohjelmistossa. Tämän vuoksi indelit, joiden pituus on > 25 bp, eivät ole todettavissa määrittysohjelmistossa.
- 4 Määrittysohjelmisto ei ehkä kohdista amplikonin readeja, joissa on äärimmäinen varianttisisältö, jolloin alue ilmoitetaan wild-tyyppiseksi. Tällainen äärimmäinen sisältö on muun muassa seuraavanlaista:
  - ▶ Enemmän kuin kolme indeliä sisältävät readit
  - ▶ Read-pituudet, jotka ovat vähintään 30 bp ja joiden yksittäisen nukleotidivariantin (SNV) pitoisuus on > 4 % amplikonin kokonaiskohdepituudesta (sondialueet pois lukien)
  - ▶ Read-pituudet, jotka ovat < 30 bp ja joiden SNV-sisältö on > 10 % kokonaisamplikonipituudesta (sondialueet mukaan lukien)
- 5 Suuret variantit, muun muassa moninukleotidivariantit (MNV:t) ja suuret indelit, voidaan ilmoittaa erillisinä pienempinä variantteina VCF-tuotostiedostossa.
- 6 Deleetiovariantit voidaan suodattaa tai jättää huomiotta, kun alueena on kaksi vierekkäistä amplikonina, mikäli deleetiopituus on suurempi tai yhtä suuri kuin vierekkäisten amplikonien välinen päällekkäisyys.
- 7 Järjestelmä ei pysty toteamaan indeleitä, mikäli ne ilmenevät välittömästi alukkeen vieressä ja mikäli päällekkäistä amplikonina ei ole. Alueilla, joilla on päällekkäisiä amplikoneja, määrittämisellä ei voida todeta deleetioita, kun päällekkäisyysalue on pienempi kuin todettavan deleetion koko. Mikäli kahden vierekkäisen amplikonin välinen päällekkäisyysalue on esimerkiksi kaksi emästä, määrittämisellä ei voida todeta deleetioita, joihin molemmat emäkset sisältyvät. Yksittäisen emäksen deleetio jommankumman emäksen kohdalla voidaan todeta.
- 8 Kuten minkä tahansa hybridisaatiopohjaisen kirjaston valmistelutyönkulun yhteydessä, piilevät polymorfismit, mutaatiot, insertiot tai deleetiot oligonukleotidejä sitovilla alueilla saattavat vaikuttaa tutkittaviin alleeleihin ja sekvensoinnin aikana tehtyihin tunnistuksiin. Esimerkkejä:
  - ▶ Varianttia faasissa, jossa on variantti alukealueella, ei ehkä amplifoida, jolloin tuloksena saadaan väärä negatiivinen tulos.
  - ▶ Aukealueella olevat variantit saattavat estää viitealleelin amplifikaation, mikä johtaa virheelliseen homotsygoottisen variantin tunnistamiseen.
  - ▶ Aukealueella olevat indelivariantit saattavat aiheuttaa väärän positiivisen tunnistuksen alukkeen vieressä olevan readin päässä.
- 9 Indelit voidaan suodattaa säikeen vääristymän vuoksi, jos ne ilmenevät yhden readin pään lähellä ja jos ne leikataan pehmeästi kohdistuksen aikana.
- 10 Pieniä MNV-kohteita ei ole validoitu, ja ne vain ilmoitetaan somaattisessa varianttimoduulissa.
- 11 Deleetioista ilmoitetaan VCF:ssä VCF-formaatin edellisen emäksen koordinaateissa. Näin ollen ota huomioon viereiset variantit ennen kuin ilmoitat yksittäisen emästunnistuksen homotsygoottiseksi viitteeksi.
- 12 Ituratakohtaiset rajoitukset:
  - ▶ NextSeq 550Dx -laite, jossa käytetään Local Run Managerin ituratavarianttimoduulia NextSeq 550Dx:lle, on suunniteltu toimittamaan kvalitatiivisia tuloksia ituradan varianttien tunnistamiseksi (esim. homotsygoottinen, heterotsygoottinen, wild-tyyppi).
  - ▶ Ituratavarianttimoduulin kanssa käytettynä oikeelliseen variantin tunnistamiseen tarvitaan vähintään 150x:n kattavuus amplikonina kohti. Tämän vuoksi tarvitaan 150 tukevaa DNA-fragmenttia, mikä vastaa 300 päällekkäistä paired-end-readia. Näytteiden määrä ja kohdennettujen emästen kokonaismäärä vaikuttavat kattavuuteen. GC-pitoisuus ja muu genomipitoisuus saattavat vaikuttaa kattavuuteen.
  - ▶ Jäljennösmäärien variaatio saattaa vaikuttaa siihen, tunnistetaanko variantti homotsygoottiseksi vai heterotsygoottiseksi.
  - ▶ Tietyissä toistuvassa kontekstissa variantit suodatetaan pois VCF-tiedostoissa. RMxN-toistosuodatinta käytetään suodattamaan variantteja, mikäli varianttisekvenssi on osittain tai kokonaan toistuvasti läsnä varianttiaseman viereisessä viitegenomissa. Ituradan variantin tunnistamisessa tarvitaan vähintään yhdeksän toistoa viitteessä, jotta variantti voidaan suodattaa. Vain toistot, joiden pituus on enintään 5 bp, otetaan huomioon (R5x9).
  - ▶ Yksittäisessä lokuksessa oleva indeli ja SNV saattavat johtaa vain yhdestä variantista ilmoittamiseen.

### 13 Somaattis-spesifiset rajoitukset.

- ▶ NextSeq 550Dx -laite, jossa käytetään Local Run Managerin somaattista varianttimoduulia NextSeq 550Dx:lle, on suunniteltu toimittamaan kvalitatiivisia tuloksia somaattisen variantin tunnistamiseen (esim. sellaisen somaattisen variantin läsnäolo, jonka taajuus on yhtä suuri tai suurempi kuin 0,026 ja määrityksen tunnistusraja 0,05).
- ▶ Somaattisen varianttimoduulin kanssa käytettynä oikeelliseen variantin tunnistamiseen tarvitaan vähintään 450x:n kattavuus oligonukleotidipoolia kohti. Tämän vuoksi tarvitaan 450 tukevaa DNA-fragmenttia oligonukleotidipoolia varten, mikä vastaa 900 päällekkäistä paired-end-readia. Näytteiden määrä ja kohdennettujen emästen kokonaismäärä vaikuttavat kattavuuteen. GC-pitoisuus ja muu genomipitoisuus saattavat vaikuttaa kattavuuteen.
- ▶ Somaattisen variantin tunnistamisessa tarvitaan vähintään kuusi toistoa viitteessä, jotta variantti voidaan suodattaa, ja huomioon otetaan vain toistot, joiden pituus on enintään 3 bp (R3x6).
- ▶ Somaattinen varianttimoduuli ei voi tehdä eroa ituradan ja somaattisten varianttien välillä. Moduuli on suunniteltu toteamaan varianteja varianttien taajuusalueiden poikki, mutta varianttien taajuutta ei voida käyttää erottamaan somaattisia varianteja ituratavarianteista.
- ▶ Näytteessä oleva normaali kudosis sisältää vaikutusta varianttien toteamiseen. Ilmoitettu toteamisraja perustuu varianttitaajuuteen suhteessa sekä tuumorista että normaalista kudoksesta poimittuun kokonais-DNA:han.

## Tuotteen osat

- 1 NextSeq 550Dx -laite (luettelonro 20005715)
- 2 NextSeq 550Dx -laitteen ohjelmisto-osat, sisältävät seuraavat:

Ohjelmistosovellus	Toiminto	Kuvaus
NextSeq 550Dx -käyttöohjelmisto (NOS)	Ohjaa laitteen toimintaa	NOS-ohjelmistosovellus hallinnoi laitteen käyttöä sekvensoinnin aikana ja tuottaa kuvia Real-Time Analysis (reaaliaikainen analyysi, RTA) -ohjelmiston käyttöön.
Real-time Analysis -ohjelmisto (RTA)	Tuottaa ensisijaista analyysia	RTA-ohjelmisto muuntaa NOS:in omat kuvat kullekin laitalle sekvensointiajon jaksosta emästen tunnistamistiedostoihin, jotka ovat syötteitä Local Run Managerin analyysimoduuleille. RTA-ohjelmistosovellus ei sisällä käyttöliittymää.
Local Run Manager	Moduulin valinnan käyttöliittymä	Local Run Manager -ohjelmisto on laitteessa suoritettava integroitu ratkaisu käyttäjähallintaan, soveltuvan analyysimoduulin valintaan ja tilan monitorointiin.
Somaattinen varianttimoduuli	Tuottaa toissijaista analyysia	Tämä Local Run Manager -analyysimoduuliohjelmisto käsittelee emästen tunnistuksia toissijaisella analyysilla. Prosessointiin kuuluvat demultipleksointi, FASTQ-tiedoston luominen, kohdistus, varianttitunnistus ja raportointi. Varianttitunnistin (Pisces) tuottaa VCF-tiedostoja, jotka sisältävät tietoa viitegenomin tietyissä sijainneissa löydetyistä varianteista ja sisältä mitatun varianttitaajuuden.
Ituratavarianttimoduuli	Tuottaa toissijaista analyysia	Tämä Local Run Manager -analyysimoduuliohjelmisto käsittelee emästen tunnistuksia toissijaisella analyysilla. Prosessointiin kuuluvat demultipleksointi, FASTQ-tiedoston luominen, kohdistus, varianttitunnistus ja raportointi. Varianttitunnistin (Pisces) tuottaa VCF-tiedostoja, jotka sisältävät tietoa viitegenomin tietyissä sijainneissa löydetyistä varianteista ja määrittää kunkin variantin heterotsygoottiseksi tai homotsygoottiseksi.

## Käyttöolosuhteet

Elementti	Määrittäminen
Lämpötila	Ylläpidettävä laboratorion lämpötila 19–25 °C (22±3 °C). Tämä lämpötila on laitteen käyttölämpötila. Ajon aikana ympäristön lämpötila ei saa vaihdella yli ±2 °C.
Kosteus	Tiivistymättömän suhteellisen kosteuden on pysyttävä välillä 20–80 %.

## Välineet ja materiaalit

### Tarvittavat, erikseen myytävät välineet ja materiaalit

NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarja v2 (300 jaksoa), luettelonro 20019554

NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarja v2.5 (300 jaksoa), luettelonro 20028871

### Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

#### Käyttäjän hankittavat tarvikkeet sekvensointiajoihin

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
Alkoholiliinat, 70-prosenttinen isopropanoli tai Etanoli, 70-prosenttinen	VWR, tuotenro 95041-714 (tai vastaava) Yleinen laboratoriotuottaja	Virtauskyvetin puhdistamiseen ja yleiskäyttöön
Laboratorioliiina, vähän nukkaava	VWR, tuotenro 21905-026 (tai vastaava)	Virtauskyvetin puhdistamiseen ja yleiskäyttöön

#### Käyttäjän hankittavat tarvikkeet laitteen huoltoon

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
NaOCl, 5-prosenttinen (natriumhypokloriitti)	Sigma-Aldrich, tuotenro 239305 (tai laboratoriotuottajaan tarkoitettu vastaava)	Laitteen pesu manuaalisella ajon jälkeisellä pesulla: laimennettu 0,12-prosenttiseksi
Tween 20	Sigma-Aldrich, tuotenro P7949	Laitteen pesu manuaalisilla pesuvaihtoehtoilla: laimennettu 0,05-prosenttiseksi
Vesi, laboratoriotuottajaan tarkoitettu	Yleinen laboratoriotuottaja	Laitteen pesu (manuaalinen pesu)
Ilmansuodatin	Illumina, tuotenro 20022240	Laitteen imemän jäähdytysilman puhdistaminen

#### Laboratoriotuottajaan tarkoitettua vettä koskevat ohjeet

Käytä instrumenttitoimenpiteissä aina laboratoriotuottajaan tarkoitettua tai deionisoitua vettä. Älä koskaan käytä vesijohtovettä. Käytä vain seuraavia vesiä tai vastaavia:

- ▶ deionisoitua vettä
- ▶ Illumina PW1 -vettä
- ▶ 18 megaohmin (MΩ) vettä
- ▶ Milli-Q-vettä
- ▶ Super-Q-vettä
- ▶ molekyylibiologiaan tarkoitettua vettä

## Varoitukset ja varotoimet



### VAROITUS

USA:n liittovaltion laki rajoittaa tämän laitteen myyntiä niin, että sen saa myydä vain lääkäri tai muu terveydenhoidon ammattilainen, jolla on kyseisen osavaltion luvat ammatin harjoittamiseen. Sama koskee laitteen käyttöä tai sen määräämistä käyttöön.

- 1 **Jotkin Illuminan toimittamat NextSeq 550Dx -laitteen kanssa käytettävät reagenssiosat sisältävät mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti.** Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (KTT) osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Käsittele kaikkia verinäytteitä aivan kuten niissä olisi tarttuvaa ihmisen immuunikatovirusta (HIV), ihmisen hepatiitti B -virusta (HBV) ja muita veren välityksellä tarttuvia taudinaiheuttajia (yleiset varotoimet).
- 3 Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voivat olla virheelliset tulokset tai näytteiden laadun merkittävä heikentyminen.
- 4 Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai sarjareagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja sarjareagenssien käsittelyn jälkeen.
- 5 On noudatettava asianmukaisia laboratoriotyön käytänteitä ja hyvää laboratoriotyön hygieniää, jotta reagenssit, instrumentit ja DNA-genominäytteet eivät kontaminoituisi. PCR-kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- 6 Jotta kontaminoituminen voidaan välttää, varmista, että vahvistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on työvaiheisiin tarkoitettut laitteet ja tarvikkeet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, koeputkiravistelijat ja sentrifugit).
- 7 Indeksien ja näytteen parinmuodostuksen tulee vastata tismalleen tulostetun alustan asettelua. Local Run Manager täyttää näytteen nimiin liitetyt indeksialukkeet automaattisesti näytteen nimillä moduuliin lisättäessä. Käyttäjää kehoitetaan tarkistamaan näytteisiin liitetyt indeksialukkeet ennen sekvensointiajan aloittamista. Näytteen ja alustan asettelun väliset yhteensopimattomuudet johtavat positiivisen näytteen tunnistuksen menetykseen ja virheellisen tuloksen raportointiin.
- 8 Käyttäjän hankkiman virustorjuntaohjelman asennusta suositellaan vahvasti, jotta tietokone olisi turvassa viruksilta. Katso asennusohjeet käyttöoppaasta.
- 9 Älä käytä NextSeq 550Dx -laitetta, jos jokin sen paneeli on irrotettu. Jos laitetta käytetään jokin paneeli irrotettuna, vaarana on altistuminen verkko- ja tasavirtajännitteille.
- 10 Älä koske virtauskyvetin virtauskyvettiasemaan. Siinä olevan lämmittimen lämpötila on 22–95 °C ja voi johtaa palovammoihin.
- 11 Laite painaa noin 84 kg (185 lb), joten sen pudottaminen tai käsitteleminen väärin voi aiheuttaa vakavan vamman.

## Käyttöohjeet

Seuraavat käyttöohjeet koskevat iturata- ja somaattisten varianttimoduulien ajoa diagnostisessa tilassa NextSeq 550Dx -laitteessa käyttämällä NextSeq 550Dx -suurtehareagenssisarjaa v2 (300 jaksoa) tai NextSeq 550Dx -suurtehareagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa).

## Ajotietojen syöttäminen

Katso tarkat tiedot NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 100000009513) ja sovellettavasta Local Run Manager -moduulin oppaasta.

## Parametrien määrittäminen

- 1 Kirjautu sisään Local Run Managerissa.
- 2 Valitse **Create Run** (Luo ajo) ja valitse **Somatic Variant** (Somaattinen variantti) tai **Germline Variant** (Ituratavariantti).
- 3 Syötä ajonimi, jossa ajo tunnustetaan sekvensoinnista analyysin kautta. Käytä alfanumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja.
- 4 **[Valinnainen]** Syötä ajon kuvaus ajon tunnustamisen helpottamiseksi. Käytä alfanumeerisia merkkejä, välilyöntejä, alaviivoja tai väliviivoja.
- 5 Valitse näytteiden määrä ja indeksijoukko pudotusvalikosta. Ota valintaa tehdessäsi huomioon seuraavat tiedot.
  - ▶ Pudotusvalikko sisältää näytteiden määrät yhdessä indeksijoukon kanssa. Esimerkiksi 24-joukko 1 viittaa 24 testattavaan näytteeseen indeksijoukon 1 indekseillä.
  - ▶ Indeksijoukon numeroilla viitataan eri i5- ja i7-indeksiparien joukkoihin. Sekä joukko 1 että joukko 2 tarjoavat indeksidiversiteettiä. Tarjotaan kaksi indeksijoukkoa avuksi yksittäisen joukon loppuunkulumisen estämiseen.
  - ▶ Valitse se näytemäärä, joka on lähinnä testaamiesi näytteiden määrää. Mikäli näytteiden tarkkaa määrää ei ole luettelossa, valitse numero, joka on lähinnä testaamaasi numeroa mutta sitä pienempi. Jos esimerkiksi haluat testata 18 näytettä, valitse 16 näytettä.
  - ▶ Ehdotetut näytteen kuopat ja indeksiyhdistelmät, jotka vastaavat indeksin diversiteettivaatimuksia, korostetaan vihreällä.

### Manifestitiedostojen tuonti ajoa varten

- 1 Varmista, että manifestitiedostot, jotka haluat tuoda, ovat saatavilla käytettävissä olevassa verkkosijainnissa tai USB -asemassa.
- 2 Valitse **Import Manifests** (Tuo manifestitiedostot).
- 3 Navigoi manifestitiedoston kohdalle ja valitse manifestitiedostot, jotka haluat lisätä.



#### HUOMAUTUS

Voit asettaa manifestitiedostot kaikkien ajojen saataville ituratavariantin tai somaattisen variantin analyysimoduulin avulla ja lisätä manifestitiedostoja Module Settings (Moduulin asetukset) -ominaisuuden avulla. Tämä ominaisuus edellyttää järjestelmänvalvojan käyttöoikeuksia. Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 100000009513)*.

### Näytteiden määrittäminen ajoa varten


Määritä näytteet ajoa varten käyttämällä yhtä seuraavista vaihtoehdoista ja ohjeista.

- ▶ **Enter Samples Manually** (Syötä näytteet manuaalisesti) – Käytä taulukkoa Create Run (Luo ajo) -näytöllä.
- ▶ **Import Samples** (Tuo näytteet) – Navigoi ulkoiseen tiedostoon muodossa, jossa käytetään pilkulla erotettuja arvoja (\*.csv). Create Run (Luo ajo) -näytöllä on saatavilla ladattava malline.


### Näytteiden syöttäminen manuaalisesti

- 1 Anna yksilöllinen näytenimi (**Somaattinen varianttianalyysimoduuli**) tai näytetunnus (**Ituratavarianttianalyysimoduuli**). Käytä alfanumeerisia merkkejä, välilyöntejä tai alaviivoja.
- 2 **[Valinnainen]** Napsauta positiivisten tai negatiivisten kontrollinäytteiden kohdalla hiiren oikeaa painiketta ja valitse kontrollityyppi. Yhden näytekuopan kontrolli täyttää vastaavan kuopan toisessa poolissa, jossa on sama kontrolli.
- 3 **[Valinnainen]** Syötä näytekuvaus Sample Description (Näytekuvaus) -kenttään. Käytä alfanumeerisia merkkejä, välilyöntejä tai alaviivoja.
- 4 Valitse Indeksien 1 sovitin Indeksien 1 (i7) pudotusvalikosta.

Kun käytät ehdotettuja näytekuoppia, ohjelmisto täyttää automaattisesti i7- ja i5-indeksisovittimet, jotka vastaavat diversiteetti-indeksin vaatimuksia. Mikäli testaamiesi näytteiden tarkka määrä ei ole luettelossa, varmista, että valitaan indeksisovittimet ylimääräisille kuopille.

- 5 Valitse Indeksien 2 sovitin Indeksien 2 (i5) pudotusvalikosta.
- 6 Valitse manifestitiedosto Manifest (Manifesti) -pudotusvalikosta. Poolin A näytteille tarvitaan toinen manifesti kuin Poolin B näytteille.
- 7 Valitse vaihtoehto levyasettelun tarkastelemiseksi, tulostamiseksi tai tallentamiseksi viitteenä kirjastojen valmistelua varten:
  - Voit näyttää levyasettelun valitsemalla  **Print** (Tulosta) -kuvakkeen. Voit tulostaa levyasettelun valitsemalla **Print** (Tulosta).
  - Valitsemalla **Export** (Vie) voit viedä näytetiedot ulkoiseen tiedostoon.
- 8 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).

#### Näytteiden tuonti

- 1 Valitse **Import Samples** (Tuo näytteet) ja selaa näytteen tietotiedoston kohtaan. Voit tuoda kahdentyyppisiä tiedostoja.
  - Valitse **Template** (Malline) Create Run (Luo ajo) -näytöltä, jotta voit luoda uuden levyasettelun. Mallinetiedosto sisältää oikeat sarakeotsikot tuontia varten. Syötä näytetiedot kuhunkin ajon näytteiden sarakkeeseen. Poista esimerkkiedot käyttämättömistä soluista ja tallenna sitten tiedosto.
  - Käytä näytetietotiedostoa, joka vietiin ituratavarianttimoduulista tai somaattisesta varianttimoduulista Export (Vienti) -ominaisuuden avulla.
- 2 Voit näyttää levyasettelun valitsemalla  **Print** (Tulosta) -kuvakkeen.
- 3 Valitse **Print** (Tulosta) levyasettelun tulostamiseksi viitteeksi kirjastojen valmistelua varten.
- 4 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).

## Reagenssikasetin valmistelu

Noudata reagenssikasetin ohjeita tarkasti sekvensoinnin onnistumisen varmistamiseksi.

- 1 Ota reagenssikasetti -25–15 °C:n säilytyslämpötilasta.
- 2 Valitse jokin seuraavista reagenssien sulatusmenetelmistä. Älä upota kasettia veteen. Kun kasetti on sulanut, kuivaa se ennen jatkamista seuraavaan vaiheeseen.

Lämpötila	Sulatusaika	Stabiilitaajaja
15–30 °C:n vesihaude	60 minuuttia	Ei yli kuutta tuntia
2–8 °C	7 tuntia	Ei yli viittä päivää



#### HUOMAUTUS

Jos samassa vesihautteessa on sulamassa useampi kuin yksi kasetti, käytä sulatukseen jonkin verran enemmän aikaa.

- 3 Käännä kasettia viisi kertaa, jotta reagenssit sekoittuvat.
- 4 Tarkista kasetin pohja varmistaaksesi, että reagenssit ovat sulaneet eikä niissä ole saostumia. Varmista, että asemat 29, 30, 31 ja 32 ovat sulaneet, sillä ne ovat suurimmat ja niiden sulaminen kestää kauemmin.
- 5 Napauta alustaa kevyesti, jotta ilmakuplat vähenevät. Parhaan tulokset saat siirtymällä suoraan näytteen lataamiseen ja ajon määrittämiseen.

## Virtauskyvetin valmistelu

- 1 Ota uusi virtauskyvetin laatikko 2 °C...8 °C:n säilytyksestä.
- 2 Ota foliopakkaus pois laatikosta ja anna sen olla huoneenlämmössä 30 minuuttia.

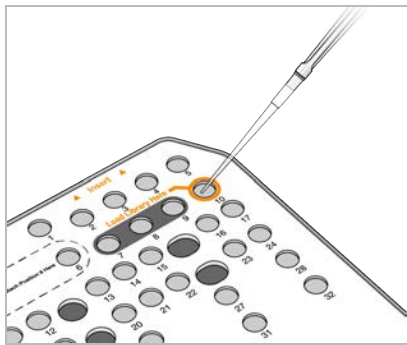
## Kirjastojen valmistelu sekvensointia varten

Denaturoi ja laimenna kirjastot 1,3 ml:n lataustilavuuteen. Käytännössä latauspitoisuus voi vaihdella kirjaston valmistelu- ja kvantifointimenetelmien mukaan. Näytekirjastojen laimennus riippuu oligonukleotidipoolien monimutkaisuudesta. Jos tarvitset ohjeita näytekirjastojen valmistelusta sekvensointia varten, mukaan lukien kirjaston laimennus ja yhdistäminen, katso käyttöohjeiden osio sovellettavasta kirjaston valmisteluserjasta. NextSeq 550Dx:ssa vaaditaan klusterien tiheyden optimointia.

## Kirjastojen lataaminen reagenssikasettiin

- 1 Puhdista nukkaamattomalla liinalla foliosinetti, joka on **Load Library Here** (Lataa kirjasto tähän) -nimisen säiliön (nro 10) päällä.
- 2 Lävistä sinetti puhtaalla 1 ml:n pipetin kärjellä.
- 3 Lataa 1,3 ml valmisteltuja kirjastoja säiliöön nro 10, jossa on merkintä **Load Library Here** (Lataa kirjasto tähän). Vältä koskemasta foliosinettiin, kun annostelet kirjastot.

Kuva 1 Kirjastojen lataaminen



## Sekvensointiajon asettaminen

- 1 Kirjautu sisään NextSeq 550Dx -laitteeseen omalla Local Run Manager -ohjelmiston salasanalla.
- 2 Valitse NOS-ohjelmiston aloitusnäytöstä **Sequence** (Sekvenssi).
- 3 Valitse ajo luettelosta ja valitse sitten **Next** (Seuraava).  
Näkyviin tulee lukuisia ajon käyttöönottonäyttöjä seuraavassa järjestyksessä: Load Flow Cell (Virtauskyvetin lataaminen), Load Buffer Cartridge (Puskurikasetin lataaminen), Load Reagent Cartridge (Reagenssikasetin lataaminen) ja Pre-run Check (Ajoa edeltävä tarkistus).
- 4 Kun näkyviin tulee Load Flow Cell (Virtauskyvetin lataaminen) -näyttö, puhdista virtauskyvetti ja lataa se sitten.
  - ▶ Ota virtauskyvetti pois foliopakkauksesta.
  - ▶ Avaa läpinäkyvä muovinen saranalaatikko ja poista virtauskyvetti.
  - ▶ Puhdista virtauskyvetin lasipinta nukkaamattomalla alkoholiliinalla. Kuivaa lasi nukkaamattomalla laboratorioliinalla.
  - ▶ Varmista, että virtauskyvetin lasipinta on puhdas. Jos tarpeen, toista puhdistusvaihe.
  - ▶ Poista edellisessä ajossa käytetty virtauskyvetti.
  - ▶ Kohdista virtauskyvetti kohdistusnastoihin ja aseta virtauskyvetti alustalle.
- 5 Valitse **Load** (Lataa).  
Ovi sulkeutuu automaattisesti, virtauskyvetin tunnus tulee näkyviin näyttöön, ja sensorit tarkistetaan.
- 6 Noudata ohjelmiston kehotteita tyhjentääksesi käytettyjen reagenssien säiliön, ladataksesi NextSeq 550Dx -puskurikasetin ja ladataksesi NextSeq 550Dx -reagenssikasetin.  
Kun NextSeq 550Dx -puskuri ja reagenssikasetit on ladattu, ohjelmisto lukee ja tallentaa RFID:n. Puskurin ja reagenssikasetin tunnuksat ilmestyvät näyttöön, ja sensorit tarkistetaan.



- 7 Kun automaattinen ajoa edeltävä tarkistus on tehty, valitse **Start** (Aloita). (Ei tarpeen, jos se on asetettu alkamaan automaattisesti määrittämissä.)
- 8 Kun ajo alkaa, sekvensointinäyttö avautuu. Tämä näyttö tarjoaa visuaalisen näytön meneillään olevasta ajosta, mukaan lukien voimakkuudet ja laatuasteet (Q-pisteet).

## Tulokset

Real-Time Analysis (reaaliaikainen analyysi, RTA) on integroitu ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatuasteet kullekin emäkselle kussakin sekvensointijaksossa. Kun ensisijainen analyysi päättyy, NextSeq 550Dx -laitteessa valittu Local Run Manager -moduuli aloittaa automaattisesti toissijaisen analyysin. Tässä kuvaillut toissijaisen analyysin menetelmät koskevat iturata- ja somaattisia varianttimoduuleita.

## Demultipleksointi

Demultipleksoinnissa verrataan kutakin Index Read -sekvenssiä ajoa varten määritettyihin indeksisekvensseihin. Tässä vaiheessa ei oteta huomioon laatuasteita.

Indeksireadit tunnistetaan suorittamalla seuraavat vaiheet:

- ▶ Näytteet numeroidaan alkaen 1:stä sen järjestyksen perusteella, jossa ne on lueteltu ajoa varten.
- ▶ Näytenumero 0 on varattu klustereille, joita ei ole määrätty näytteeseen.
- ▶ Klusterit määrätään näytteeseen, kun indeksisekvenssi on tarkka osuma tai kun indeksireadia kohti on enintään yksi yhteensopimattomuus.

## FASTQ-tiedoston luonti

Demultipleksoinnin jälkeen ohjelmistossa luodaan välianalyysitiedostoja FASTQ-muodossa. Se on tekstimuoto, jota käytetään sekvenssien esittämiseen. FASTQ-tiedostot sisältävät readeja kustakin näytteestä ja niihin liittyvistä laatuasteista. Klusterit, jotka eivät läpäisseet suodatinta, jätetään pois.

Jokainen FASTQ-tiedosto sisältää readeja vain yhdestä näytteestä, ja kyseisen näytteen nimi sisällytetään FASTQ-tiedoston nimeen. Iturata- ja somaattisissa varianttimoduuleissa luodaan kahdeksan FASTQ-tiedostoa näytettä ja oligopoolia kohden, neljä readista 1 ja neljä readista 2. Tuotoksissa on yhteensä 8 ja 16 FASTQ-tiedostoa näytettä kohden järjestyksessä iturataa ja somaattista varten. FASTQ-tiedostot ovat kohdistuksen pääasiallisia syötetietoja.

## Kohdistus

Kohdistusvaiheen aikana Smith-Waterman-algoritmi kohdistaa kunkin näytteen klusterit manifestitiedostossa määritettyihin ampikonisekvensseihin nähden.

Porrastettu Smith-Waterman-algoritmi suorittaa puolittain globaaleja sekvenssikohdistuksia määrittääkseen samankaltaisia alueita kahden sekvenssin välissä. Koko sekvenssin vertailemisen sijasta Smith-Waterman-algoritmillä verrataan kaikenpituaisia segmenttejä.

Jokaista parillisen pään readia arvioidaan suhteessa sen kohdistukseen kyseisen readin asiaankuuluviin sondisekvensseihin nähden.

- ▶ Read 1 arvioidaan loppupään lokusspesifisten oligojen (Downstream Locus-Specific Oligos I. DLSO) käänteiseen täydennykseen nähden.
- ▶ Read 2 arvioidaan alkupään lokusspesifisiin oligoihin (Upstream Locus-Specific Oligos I. ULSO) nähden.
- ▶ Mikäli readin alku vastaa sondisekvenssiä, jossa on enintään kolme eroa (johtavista indeleista aiheutuvaa yhteensopimattomuutta tai siirtymää), readin koko pituus kohdistetaan kyseisen sekvenssin ampikonikohteeseen nähden.
- ▶ DLSO:n ja ULSO:n sisäisiä indeleitä ei havainnoida määrittämissä kemian huomioita ottaen.

Kohdistukset suodatetaan kohdistustuloksista yhteensopimattomuusasteiden perusteella joko kohdealueelta tai koko ampikonista ampikonin pituuden mukaan. Suodatetut kohdistukset kirjoitetaan kohdistustiedostoihin kohdistamattomina, eikä niitä käytetä varianttien tunnistamiseen.

## Varianttitunnistus

Pisces-varianttitunnistus on suunniteltu tekemään SNV- ja indelvarianttitunnistuksia kirjastoista, jotka on valmisteltu laitetta varten.

## Raportit ja muut tuotostiedostot

Varianttianalysimoduulit tuottavat PDF- ja sarakkeellisia (\*.txt) raportteja, jotka näyttävät eri mittareita, kuten sekvensointisyvyys ja varianttilukemat. Moduulit tuottavat lisäksi tuotostiedostoja, kuten VCF:n ja genomien varianttitunnistusmuodon (gVCF) tiedoston variantin tunnistussovelluksia varten.

## Laadunvarmistusmenetelmät

NextSeq 550Dx -ohjelmisto arvioi kunkin ajon, näytteen ja emäksen tunnistuksen laadunvarmistusmittareiden perusteella. Positiivisia ja negatiivisia kontroleja suositellaan myös kirjaston valmistuksessa, ja ne tulee arvioida. Arvioi kontrollit seuraavasti:

- **Negatiivinen kontrolli (ei mallikontrollia) tai toinen negatiivinen kontrolli**— Odotetun tuloksen tulee syntyä. Jos negatiivinen kontrolli saa aikaan odotetusta poikkeavan tuloksen, se voi johtua virheestä näytteseurannassa, virheellisestä indeksointialukkeiden tallennuksesta tai kontaminaatiosta.
- **Positiivinen kontrollinäyte**— Odotetun tuloksen tulee syntyä. Jos positiivinen kontrolli saa aikaan odotetusta poikkeavan tuloksen, se voi johtua virheestä näytteseurannassa tai virheellisestä indeksointialukkeiden tallennuksesta.

## Suorituskykyominaisuudet

NextSeq 550Dx -laitteen suorituskykyominaisuudet määritettiin käyttämällä iturata- ja somaattisia varianttimoduuleja TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:n ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjan v2 (300 jaksoa) kanssa, ja ne vahvistettiin käyttämällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjaa v2.5 (300 jaksoa). Tutkimuksiin sisältyivät näytteen indeksointi, näytteen siirto, DNA:n syöte, analyttinen herkkyys (tyhjän raja / määrityksen tunnistusraja), tarkkuus, menetelmän vertailu ja toistettavuus.

Analyttiset tutkimukset, joissa käytettiin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjaa v2.5 (300 jaksoa), suunniteltiin aiemmin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjalle v2 (300 jaksoa) määritettyjen suorituskykyväitteiden arvioimiseen. Tulokset osoittivat, että reagenssarjojen (v2 ja v2.5) suorituskyky on vertailukelpoinen TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää käyttämällä. Katso *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:n pakkausselosteesta* tietoa suorituskykyominaisuuksista, jotka liittyvät analyysia edeltäviin tekijöihin, kuten eristämismenetelmiin tai häiritseviin aineisiin.

## Suorituskykyominaisuuksissa käytettyjen laskelmien määritelmät

- 1 **Positiivinen yhtäpitävyysprosentti (PPA)** lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu varianteiksi viitemenetelmällä ja jotka määrittäminen oikeaoppisesti ilmoittaa.
  - ▶ (määrityksen oikeaoppisesti ilmoittamien varianttisijaintien luku) / (varianttisijaintien kokonaisluku)
 Varianttisijainnit, jotka määrittäminen ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita positiivisia (TP). Varianttisijainnit, jotka määrittäminen ilmoittaa viitetunnistuksiksi tai erilaisiksi varianttitunnistuksiksi, ovat vääriä negatiivisia (FN).
- 2 **Negatiivinen yhtäpitävyysprosentti (NPA)** lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu wild-tyyppisiksi viitemenetelmällä ja jotka määrittäminen oikeaoppisesti ilmoittaa.
  - ▶ (määrityksen oikeaoppisesti ilmoittamien wild-tyyppisten sijaintien luku) / (wild-tyyppisten sijaintien kokonaisluku)
 Wild-tyyppiset sijainnit, jotka määrittäminen ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita negatiivisia (TN). Wild-tyypin sijainnit, jotka määrittäminen ilmoittaa variantteina, ovat vääriä positiivisia (FP).
- 3 **Yleinen yhtäpitävyysprosentti (OPA)** lasketaan osuutena sijainneista, jotka määrittäminen on oikeaoppisesti ilmoittanut suhteessa viitemenetelmään.

- ▶ ((määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama varianttien sijaintien luku) + (määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama wild-tyyppisten sijaintien luku)) / ((varianttien sijaintien luku yhteensä) + (wild-tyyppisten sijaintien luku yhteensä))
- 4 PPA:n, NPA:n ja OPA:n laskelmat eivät sisällä ei-tunnistuksia (variantin tai viitteen sijainteja, jotka eivät täytä yhtä tai useampaa laatusuodatinta).
- 5 Autosomin tunnistusaste lasketaan suodattimet läpäisevien sijaintien kokonaislukuna, joka jaetaan kromosomeille 1–22 sekvensoitujen paikkojen yhteismäärällä; kromosomit X ja Y poissuljetaan. Tämä mittari ei ota huomioon tunnistusten yhteneväisyyttä viitemenetelmän kanssa.

## NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjan v2 (300 jaksoa) suorituskyky

### Näytteen indeksointi

Näytteen indeksialukkeet, jotka lisättiin kirjaston valmistelun aikana, antavat yksilöllisen sekvenssin kullekin näyte-DNA:lle. Näiden yksilöllisten sekvenssien avulla monet näytteet voidaan yhdistää yhteen sekvensointiajossa. Näytteen indeksoimista käytetään sekä iturata- että somaattisissa työkuluissa. Tällä tutkimuksella tahdottiin määrittää vähimmäismäärä (8) ja enimmäismäärä (96) näytteille, jotka voidaan prosessoida yhdessä sekvensointiajossa NextSeq 550Dx -laitteessa. Kahdeksaa yksilöllistä Platinum Genomen näytettä testattiin 12 eri indeksialukeyhdistelmällä näytettä kohti. Näytetuloksia neljästä sekvensointiajosta ituratavarianttimoduulia käyttämällä vertailtiin Platinum Geomesin versioon 2016-1.0

Ensimmäisen ajosarjan kohdalla testattiin 96 yksilöllisesti indeksoitua näytekirjastoa edustavalla määrityksellä, joka on suunniteltu suorittamaan haku eri geeneille kattaen 12 588 emästä säiettä kohti kaikissa 23 ihmiskromosomissa sen varmistamiseksi, voiko määrittäminen tehdä genotyyppisen tunnistuksen yhdenmukaisesti annetun näytteen kohdalla eri indeksialukeyhdistelmissä. Toisten ajosarjojen kohdalla sekvensoitiin kahdeksan yksilöllisesti indeksoitua näytekirjastoa kahdessa sekvensointiajossa tuettujen indeksien vähimmäisnumeron varmistamiseksi.

96 indeksin ajoissa PPA SNV:ille vaihteli välillä 98,7–100%, PPA insertioille ja deleetioille oli 100 % ja NPA oli 100 % kussakin 96 indeksiyhdistelmässä. 8 indeksin ajojen PPA-arvot ovat 100 % (SNV:t, insertiot ja deleetiot) ja NPA oli 100 % kussakin kahdeksassa indeksiyhdistelmässä.

### Näytteen siirto

NextSeq 550Dx -laitteella on mahdollista sekvensoida monta näytettä ja sekä tehdä monia tarkistuksia yhdessä sekvensointiajossa. Tutkimus suoritettiin näytteen siirron laajuuden arvioimiseksi sekvensointiajossa (ajon sisällä) ja sekvensointiajojen välissä (ajosta ajoon). Kaksi Platinum Genomen näytettä, yksi uros ja yksi naaras, testattiin edustavalla määrityksellä, joka on suunniteltu suorittamaan hakuja eri geeneille 12 588 emäksestä (150 amplikonista) 23 eri kromosomissa, mukaan lukien molemmissa sukukromosomeissa. Kirjastot sekvensoitiin NextSeq 550Dx -laitteessa käyttämällä ituratavarianttimoduulia. Siirto urosnäytteistä naarasnäytteisiin havaittiin tarkkailemalla Y-kromosomin amplikonin readien läsnäoloa naarasnäytteissä.

Ajon sisäinen siirto voidaan ottaa käyttöön klusterin luomisen, indeksin jakson emästen tunnistuksen ja näytteen demultipleksoinnin aikana. Näytteen siirron testaamiseksi sekvensointiajon aikana sekvensoitiin kerran kirjastopooli, johon kuului 46 replikaattia kustakin uros- ja naarasnäytteestä sekä neljä ei-mallikontrollia NextSeq 550Dx -laitteessa. Ajon sisäinen näytesiirto arvioitiin vertailemalla Y-kromosomin amplikonin kattavuutta kussakin naarasreplikaatissa keskimääräiseen Y-kromosomin amplikonin kattavuuteen kaikissa poolin urosreplikaateissa. Keskimääräinen havaittu ajon sisäinen siirto oli 0,084 %.

Ajosta ajoon -näytteen siirron testaamiseksi valmistettiin kaksi kirjastopoolia, jotka sitten sekvensoitiin yhdellä NextSeq 550Dx -laitteella. Ensimmäinen pooli sisälsi 46 replikaattia naarasnäytteestä sekä kaksi ei-mallikontrollia. Toinen pooli sisälsi 46 toistoa urosnäytteestä sekä kaksi ei-mallikontrollia. Molemmat poolit käyttivät samaa indeksin sovittimien sarjaa. Naaraspooli sekvensoitiin ensin, minkä jälkeen vuorossa oli sekvensointiajo urospoolilla, minkä jälkeen tehtiin toinen toistosekvensointiajo naaraspoolilla. Ajosta ajoon -näytesiirto arvioitiin vertaamalla Y-kromosomin amplikonin laajuutta naaraspoolin toistoajon ja urospoolin ajon vastaavien replikaattien välillä. Keskimääräinen havaittu ajosta ajoon -siirto oli 0,0076 %.

## DNA-syöte

Veri (iturata)

Veren DNA:n syöteväli TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -kirjaston valmistuksessa, kun käytettiin ituratavarianttimoduulin työnkulkua, määritettiin NextSeq 550Dx -laitteelle. Tämä vaihteluväli arvioitiin käyttämällä sarjalaimennustutkimusta, jossa käytettiin 13 Platinum Genome -näytettä, joiden edustava määrittäminen oli suunniteltu suorittamaan haku useista geeneistä ja 12 588 emäksestä 23 eri kromosomissa. Kirjasto sekvensoitiin kahdella NextSeq 550Dx -laitteella käyttämällä yhtä erää NextSeq 550Dx -suurtehoagensisarjaa v2 (300 jaksoa).

Viisi näytettä testattiin kaksoiskappaleena viidellä DNA:n syötetasolla välillä 250–12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ja 12 ng). Kahdeksan näytettä testattiin yhtenä replikaattina kullakin viidestä DNA:n syötetasosta. Tarkkuuden määrittämiseksi näytegenotyyppiä verrattiin Platinum Genomesin versioon 2016-1.0. Tulokset määritettiin kullakin syötetasolla. Kunkin varianttityypin PPA (SNV:t, insertiot ja deleetiot) annetaan **Taulukko 1**; NPA annetaan **Taulukko 2**. Kaikkien syötetasojen tarkkuus oli samankaltainen. Suositeltu DNA-syöte TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:lle on 50 ng, ja 25 ng ja 100 ng tarjoavat ala- ja ylärajan suorituskykyominaisuuksien täyttämiseksi.

Taulukko 1 Kunkin DNA-syötteen PPA-tulokset varianttityypeittäin

DNA-syöte (ng)	Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	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	Insertio	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	Deleetio	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

Taulukko 2 NPA kullekin DNA-syötelle

DNA-syöte (ng)	TN	FP	Viitteen ei-tunnistukset	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 (somaattinen)

Formaliiniin fiksoidun ja parafiinilla peitetyn (FFPE:n) DNA:n syöteväli TruSeq Custom Amplicon Kit Dx -kirjaston valmistuksessa, kun käytettiin somaattisen varianttimoduulin työkulkua, määritettiin NextSeq 550Dx -laitteelle. DNA:n syöteväli arvioitiin käyttämällä sarjalaimennustutkimusta, jossa käytettiin kolmea Platinum Genome -näytettä, jonka edustava määrittäminen oli suunniteltu suorittamaan haku useista geeneistä ja 12 588 emäksestä 23 eri kromosomissa. Platinum Genomen solulinjat GM12878 ja GM12877 fiksoitiin formaaliiniin ja peitettiin parafiinilla DNA:n eristämisen jälkeen. GM12878:aa laimennettiin GM12877:llä siten, että variantin alleelitaajuudet (VAF:it) 81 variantille (55 SNV:ää, 10 insertiota ja 16 deleetiota) olivat lähellä arvoja 0,025, 0,05 tai 0,10. Lisäksi kussakin näytteessä oli 91 varianttia, ja korkeimmat varianttitaajuudet olivat enintään 1,0 VAF. Näytteet prosessoitiin kaksoiskappaleina viidellä DNA:n syötetasolla, joissa keskimääräinen deltan määrällinen jakso (dCq) oli 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 ja 7,8 TruSeq Custom Amplicon Dx -FFPE QC -sarjan mittaamana. Jokainen kirjasto sekvenssoitiin kahdella NextSeq 550Dx -laitteella käyttämällä kahta erää NextSeq 550Dx -suurtehoagenssarjaa v2 (300 jaksoa). Tarkkuuden määrittämiseksi näytteen varianttitunnistuksia verrattiin Platinum Genomesin versioon 2016-1.0. PPA kunkin varianttityypin osalta (SNV:t, insertiot ja deleetiot) annetaan [Taulukko 3](#); NPA annetaan [Taulukko 4](#). Suositeltu DNA-syöte varianteille arvossa 0,05 VAF tai suurempi, on  $dCq \leq 4$ , jossa 4,6 antaa alarajan suorituskykyominaisuuksien saavuttamiseksi.

Taulukko 3 Kunkin DNA-syötteen PPA-tulokset varianttityypeittäin

dCq:n keskiarvo	Varianttityyppi	Odotetut variantit	Odotetut ei-tunnistukset	Kohdelaimennus VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variantin ei-tunnistukset	PPA (%)	Variantin ei-tunnistukset	PPA (%)	Variantin ei-tunnistukset	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ei sovelleta.	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	Insertio	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	Deleetio	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

Taulukko 4 NPA kullekin DNA-syötteelle

dCq:n keskiarvo	Odotettu wild-tyyppi	Kohdelaimennus VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Viitteen ei-tunnistukset	NPA (%)	Viitteen ei-tunnistukset	NPA (%)	Viitteen ei-tunnistukset	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

### Analyttinen herkkyys (tyhjän raja [LoB] ja määrittämisen tunnistusraja [LoD])

Tämä tutkimus tehtiin tyhjän rajan (LoB) ja määrittämisen tunnistusrajan (LoD) arvioimiseksi somaattiselle varianttimoduulille NextSeq 550Dx -laitteessa. Tämä suoritettiin käyttämällä edustavaa määrittämistä, joka on suunniteltu suorittamaan haku useista geeneistä ja 12 588 emäksestä 23 eri kromosomissa. Platinum Genomen solulinjat GM12878 ja GM12877 fiksoitiin formaaliin ja peitettiin parafiinilla DNA:n eristämisen jälkeen. GM12878:aa laimennettiin GM12877:llä siten, että variantin taajuudet 74 variantille (53 SNV, 7 insertiota ja 14 deleetiota) olivat  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 ja laimennettu GM12878 (GM12878-D) testattiin kuutena peräkkäisenä aloituspäivänä yhdellä laitteella vaihdellen kahden NextSeq 550Dx -suurtehoagenssisarjan v2 (300 jaksoa) erän välillä yhteensä kuuden sekvensointiajon pituudelta. Tämä testi tuotti 60 replikaattia kullekin variantille GM12878-D:ssä ja 72 replikaattia kullekin vastaavalle wild-tyypin koordinaatille GM12877:ssä kullekin reagenssierälle. LoB ja LoD laskettiin käyttämällä perinteistä lähestymistapaa, CLSI EP17-A2, ei-parametrisellä menetelmällä. LoB ja LoD laskettiin SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden osalta erikseen yhdistämällä eri taajuudet tietyn varianttityypin osalta. Tyypin I virheeksi määritettiin 0,01, ja tyypin II virheeksi määritettiin 0,05.

LoB:n osalta yhdistetyt varianttitaajuudet järjestettiin alimmasta ylimpään, ja 99. sija kullekin reagenssierälle kussakin varianttityypissä laskettiin (Taulukko 5). Somaattinen varianttimoduuli käyttää raja-arvoa (todellinen LoB) 0,026 VAF varianttien laadullisen havaitsemisen määrittämiseksi. Laskettu LoB vahvisti, että tämä raja-arvo saa aikaan tyypin I virheen, joka on enintään 0,01.

Taulukko 5 Tyhjän raja

Varianttityyppi	Havaintoja yhteensä	LoB:n reagenssierä 1 (%)	LoB:n reagenssierä 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insertio	504	0,56	0,56
Deleetio	1008	1,20	1,20

LoD:n osalta yksittäisen mutaatiotaajuuden prosenttimäärä kullekin reagenssierälle kussakin varianttityypissä, joka on alle raja-arvon 0,026, laskettiin Taulukko 6 Koska prosenttimäärät olivat pienemmät kuin tyypin II virhe, 5 % (0,05), yhdistettyjen varianttitaajuuksien keskiarvo laskettiin LoD-arvona (Taulukko 6). Kunkin varianttityypin LoD otettiin suurempana kahdesta arvosta, jotka laskettiin kahden reagenssin erälle – 4,97 % SNV:ille, 5,12 % insertioille ja 5,26 % deleetioille.

Taulukko 6 Määrittelyn tunnistusraja

Reagenssierä	Varianttityyppi	Havainnot yhteensä	VAF-mittausten lukema < 2,6 %	% VAF-mittauksista < 2,6 %	Määrittelyn tunnistusraja (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insertio	420	6	1,4	5,08
	Deleetio	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insertio	420	5	1,2	5,12
	Deleetio	840	7	0,80	5,26

## Tarkkuus

### Iturata

Seuraava tutkimus suoritettiin variantin tunnistustarkkuuden arvioimiseksi ituratavarianttimoduulissa NextSeq 550Dx -laitteessa käyttämällä NextSeq 550Dx -suurteho-reagenssierä v2 (300 jaksoa). 13 yksilöllistä Platinum Genome -näytettä testattiin käyttämällä edustavaa määrittelyä, joka on suunniteltu suorittamaan haku useista geeneistä, jotka kattavat 12 588 emästä (150 amplikonina) 23 eri kromosomissa. Yhteensä yhdeksän ajoa suoritettiin käyttämällä kolmea sekvensointilaitetta, kolmea reagenssierää ja kolmea operaattoria viiden aloituspäivän aikana. SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden tarkkuus määritettiin SNV:ille, insertioille ja deleetioille vertailemalla tuloksia hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään, joka on Platinum Genomesin versioon 2016-1.0. Luottamukselliset genomialueet määritettiin tämän viitemenetelmän mukaisesti, ellei toisin mainita.

Taulukko 7 Yhteenveto ituratayhteneväisyydestä

Kriteerit	Havainnot yhteensä <sup>1</sup>	Havaintokohtainen tulos <sup>2</sup>	Ajokohtainen tulos <sup>3</sup>
PPA SNV:ille	819	98,7	> 99,9
PPA insertioille	819	95,0	98,9
PPA deleetioille	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Laskettu näyttemääränä ajoa kohden (91) x ajojen lukumäärä (9) = 819.

<sup>2</sup>Alhaisin havaittu arvo näyttereplikaatin perusteella kaikissa 9 ajossa.

<sup>3</sup>Alhaisin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

**Taulukko 8** sisältää tutkimustiedot, joissa on positiivinen ja negatiivinen prosenttiyhteneväisyys näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan Platinum Genomesin versioon 2016-1.0 PPA:n laskentoihin varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

Taulukko 8 Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti

Näyte	Keskimmäinen tunnistusaste	Odotetut variantit <sup>1</sup>	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751464	0	> 99,9	100	> 99,9

Näyte	Keskimääräinen tunnistusaste	Odotetut variantit <sup>1</sup>	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	TN	FP	PPA	NPA	OPA
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> Varianttien kokonaismäärä kaikissa näyttereplikaateissa 9 ajossa.

**Taulukko 9** sisältää tutkimustiedot näytekohtaisesti, ja niissä varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään. Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – tunnistus arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu.

**Taulukko 9** Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella

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

Näytteitä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indelien) tunnistamiseksi. Yleinen yhteenveto annetaan **Taulukko 10**. Indeleitä oli yhteensä 71, ja niiden koko vaihteli välillä 1–24 bp insertioille ja 1–25 bp deleetioille.

**Taulukko 10** Ituradan indelin tunnistamisen yhteenveto

Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	PPA
Insertio	18522	18018	27	477	99,9
Deleetio	17388	17073	0	315	100



Edustavaan määritykseen kuului 150 amplikonin, jotka oli suunniteltu kattamaan eri genomisisältöä. Amplikonien GC-sisältö vaihteli välillä 0,19–0,87. Amplikoneilla oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotidin ja trinukleotidin toistoja. Tiedot laadittiin amplikoniperusteisesti (Taulukko 11), jotta voidaan määrittää genomisisällön vaikutus oikeiden tunnistusten prosenttiin. Oikeiden tunnistusten prosenttiin kuuluvat variantti- ja viitetunnistukset, ja se on alle 100 %, jos läsnä on virheellisiä tunnistuksia tai ei tunnistuksia ollenkaan.

Taulukko 11 Ituradan amplikonitason tarkkuus

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
1	1	36450499	36450591	93	93	Indeli	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indeli	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indeli	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indeli	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indeli	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indeli	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indeli	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indeli	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	–	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indeli	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indeli	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indeli	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indeli	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indeli	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	–	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indeli	0,49	57330	0	0	100

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkuperäinen ID	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset	
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indeli	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	–	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indeli	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indeli	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	–	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	–	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indeli	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indeli	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indeli	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indeli	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indeli	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indeli	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	–	0,44	59787	0	0	100

Amplikonin nimi	Kromosomi	Amplikonin alkuperäinen ID	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisuudella alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
44	7	66276100	66276187	88	88	Indeli	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indeli	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indeli	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indeli	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	-	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indeli	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	-	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indeli	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indeli	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indeli	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	-	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indeli	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indeli	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indeli	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indeli	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	-	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	-	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	-	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indeli	0,46	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
69	11	47470345	47470444	100	100	–	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indeli	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	–	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	–	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indeli	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indeli	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indeli	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	–	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	–	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indeli	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indeli	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indeli	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	–	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indeli	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indeli	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indeli	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indeli	0,62	76986	0	0	100

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkupää	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisuusalueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset	
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indeli	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indeli	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indeli	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	-	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indeli	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	-	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indeli	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indeli	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indeli	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indeli	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indeli (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indeli	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	-	0,37	74529	0	0	100

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin alkuperäinen alku	Amplikonin alkuperäinen loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäilytys	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indeli	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indeli	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indeli	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	–	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	–	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	–	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	–	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	–	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), indeli	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indeli	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indeli	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indeli	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indeli	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indeli	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indeli	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indeli	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	–	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indeli	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	–	0,6	81081	0	0	100

Amplikonin	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
144	22	47081347	47081438	92	92	Indeli	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	–	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	–	0,55	0	0	0	–
149	Y	2655519	2655609	91	0	–	0,48	0	0	0	–
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	–

NA12878-näytteen sekvensointituloksia verrattiin NA12878:n korkean luotettavuuden genotyyppiin, jonka kansallinen standardointi- ja teknologiainstituutti (NIST) on määrittänyt (v.2.19). 150 amplikonista 92 amplikonista sisältyi kokonaan korkean luotettaville genomialueille. 41 amplikonista oli osittain päällekkäinen ja 17 amplikonilla ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssillä. Tämä sai aikaan 10 000 replikaattikohtaista koordinaattia vertailua varten. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin luotuun ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19. Tarkkuustulokset annetaan **Taulukko 12**.

Taulukko 12 NA12878-näytteen ituratayhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa

Näyte	Amplikonien lukema	Keskimääräinen tunnistusaste	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Tämän yhdeksän ajon ituratatutkimuksen antamien tietojen perusteella NextSeq 550Dx -laite kykenee yhdenmukaisesti sekvensoimaan

- ▶ GC-sisällön, joka on  $\geq 19$  % (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 19 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,6 %)
- ▶ GC-sisällön, joka on  $\leq 87$  % (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 87 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)
- ▶ PolyA-pituudet, jotka ovat  $\leq 9$  (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on yhdeksän nukleotidin PolyA-toistoa, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)
- ▶ PolyT-pituudet, jotka ovat  $\leq 10$  (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on kymmenen nukleotidin PolyT-toistoa, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)
- ▶ PolyG-pituudet, jotka ovat  $\leq 7$  (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on seitsemän nukleotidin PolyG-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistusten arvolla 1,0 %)
- ▶ PolyC-pituudet, jotka ovat  $\leq 6$  (kaikki tunnistetut emäkset 2457 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on kuusi nukleotidin PolyC-toistoa, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)
- ▶ Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 11x$  (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 11x dinukleotidin toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistusten arvolla 0,5 %)
- ▶ Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 5x$  (kaikki tunnistetut emäkset 819 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 5x trinukleotidin toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistusten arvolla 0,5 %)
- ▶ Insertiopituudet  $\leq 24$  (66343 66370:sta tunnistetusta emäksestä 819 sekvensoidussa amplikonissa, jotka sisältävät 24 nukleotidin insertiota, jota kutsutaan oikein 1,2 %:n ei-tunnistusravolla; ei virheellisiä tunnistuksia alueella, joka sisältää 24 nukleotidin insertion)
- ▶ Deleetiopituudet  $\leq 25$  (kaikki tunnistetut emäkset 2457 sekvensoidussa amplikonissa, jotka sisältävät 25 nukleotidin deleetion, tunnistettiin oikein ilman ei-tunnistuksia)

### Somaattinen

Tässä kuvailtua tutkimusta käytettiin variantin tunnistustarkkuuden arvioimiseksi NextSeq 550Dx -laitteen somaattisessa varianttimoduulissa käyttäen NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2 (300 jaksoa).

Tutkimuksessa käytettiin edustavaa määrittystä, joka on suunniteltu suorittamaan haku eri geeneistä ja 12 588 emäksestä (150 amplikonista) 23 eri kromosomissa. Platinum Genomen DNA erotettiin FFPE-käsittelyistä lohkoista, jotta voitiin luoda kuusi ainutkertaista näytettä tutkimuksessa arvioitaviksi.

Näyte GM12877 DNA laimennettiin näytteellä GM12878 DNA GM12877-D5:n ja GM12877-D7:n luomiseksi yksilöllisiksi heterotsygoottisiksi varianteiksi, joiden varianttitaajuudet ovat lähellä arvoja 5 % ja 7 %. Näyte GM12878 DNA laimennettiin samoin näytteen GM12877 DNA:lla GM12878-D5:n ja GM12878-D7:n luomiseksi. Jokainen näyte testattiin kolmoiskappaleena, paitsi laimennetut näytteet, jotka testattiin kuutena kappaleena. Yhteensä yhdeksän ajoa suoritettiin käyttämällä kolmea sekvensointilaitetta, kolmea reagenssierää ja kolmea operaattoria viiden aloituspäivän aikana. SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden tarkkuus määritettiin vertailemalla tuloksia hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään, joka on Platinum Genomesin versio 2016-1.0. Luottamukselliset genomialueet määritettiin tämän viitemenetelmän mukaisesti, ellei toisin määritetty.



Taulukko 13 Yhteenvedo somaattisesta yhteneväisyydestä

Kriteerit	Havaintoja yhteensä <sup>1</sup>	Havaintokohtainen tulos <sup>2</sup>	Ajokohtainen tulos <sup>3</sup>
PPA SNV:ille	378	98,9	99,9
PPA insertioille	378	96,9	99,9
PPA deleetioille	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Laskettu näytemääränä ajoa kohden (42) x ajojen lukumäärä (9) = 378.

<sup>2</sup>Alhaisin havaittu arvo näyttereplikaatin perusteella kaikissa 9 ajossa.

<sup>3</sup>Alhaisin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

**Taulukko 14** sisältää tutkimustiedot, joissa on positiivinen ja negatiivinen prosenttiyhteneväisyys näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään PPA:n laskelmia varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

Taulukko 14 Somaattinen yhteneväisyys näytteelle

Näyte	Keskimmä- räinen tunnis- tusaste	Odotettu	TP	FN	Variantin ei-tunnis- tukset	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

**Taulukko 15** sisältää tutkimustiedot näytekohtaisesti, ja niissä varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään. Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – tunnistus arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu.

Taulukko 15 Somaattinen yhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella

Näyte	SNV:t			Insertiot			Deleetiot		
	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0

Näyte	SNV:t			Insertiot			Deleetiot		
	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Kymmentä näytettä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indeliin) tunnistamiseksi (Taulukko 16). Indeleitä oli yhteensä 71, ja niiden koko vaihteli välillä 1–24 bp insertioille ja 1–25 bp deleetioille.

Taulukko 16 Somaattisen indelin tunnistamisen yhteenveto

Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	PPA
Insertio	10773	10282	9	482	99,2
Deleetio	11502	10667	5	830	> 99,9

150 amplikonin oli suunniteltu kattamaan eri genomisältöjä. Amplikonien GC-sisältö vaihteli välillä 0,19–0,87 %. Amplikoneilla oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotidin ja trinukleotidin toistoja. Tiedot laadittiin amplikoniperusteisesti (Taulukko 17), jotta voidaan määrittää genomisällön vaikutus oikeiden tunnistusten prosenttiin. Oikeiden tunnistusten prosenttiin kuuluvat variantti- ja viitetunnistukset, ja se on alle 100 %, jos länä on virheellisiä tunnistuksia tai ei tunnistuksia ollenkaan.

Taulukko 17 Somaattinen amplikonitason tarkkuus

Amplikoni	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
1	1	36450499	36450591	93	93	Indeli	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indeli	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indeli	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indeli	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indeli	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indeli	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indeli	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indeli	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	–	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indeli	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indeli	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	–	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indeli	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indeli	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	–	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indeli	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisäilytys	GC-säilytys	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indeli	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	–	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indeli	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indeli	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	–	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	–	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indeli	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indeli	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indeli	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indeli	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indeli	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indeli	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	–	0,44	27575	0	28	99,9

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin alkuperäinen alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheeliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
44	7	66276100	66276187	88	88	Indeli	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indeli	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indeli	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indeli	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	–	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indeli	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	–	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indeli	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indeli	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indeli	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	–	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indeli	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indeli	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indeli	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indeli	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	–	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	–	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	–	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indeli	0,46	26318	0	153	99,4

Amplikon	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheeliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
69	11	47470345	47470444	100	100	–	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indeli	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	–	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	–	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indeli	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indeli	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indeli	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	–	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	–	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indeli	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indeli	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indeli	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	–	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indeli	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indeli	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indeli	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indeli	0,62	35472	0	69	99,8

Amplikonin	Kromosomi	Amplikonin alkuperä	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisuudella alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnus-	Virheel-	Ei tunnis-	% oikeat
								tunnukset	liset tunnis-	tunnukset	tunnukset
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indeli	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indeli	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indeli	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	-	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indeli	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	-	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indeli	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indeli	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indeli	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indeli	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indeli (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indeli	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indeli	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	-	0,37	34386	0	12	> 99,9

Amplikonin kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin alkuperäinen kromosomi	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheeliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indeli	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indeli	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indeli	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	–	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	–	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	–	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	–	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	–	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), indeli	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indeli	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indeli	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indeli	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indeli	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indeli	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indeli	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indeli	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	–	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indeli	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	–	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indeli	0,66	34754	0	22	99,9



Amplikonin	Kromosomi	Amplikonin alku	Amplikonin loppu	Analysoidun fragmentin koko	Emäkset luottamuksellisilla alueilla	Amplikonin genomisisältö	GC-sisältö	Oikeat tunnistukset	Virheeliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	% oikeat tunnistukset
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	–	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	–	0,55	0	0	0	–
149	Y	2655519	2655609	91	0	–	0,48	0	0	0	–
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	–

GM12878-näytteen sekvensointituloksia verrattiin NA12878:n korkean luotettavuuden genotyyppiin, jonka kansallinen standardointi- ja teknologiainstituutti (NIST) on määrittänyt (v.2.19). 150 amplikonista 92 amplikonია sisältyivät kokonaan erittäin luotettaville genomialueille. 41 amplikonია olivat osittain päällekkäisiä ja 17 amplikonilla ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssillä. Tämä sai aikaan 10 000 replikaattikohtaista koordinaattia vertailua varten. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin luotuun ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19. Tarkkuustulokset annetaan **Taulukko 18**.

Taulukko 18 GM12878-näytteen somaattinen yhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa

Näyte	Amplikonien lukema	Keskimääräinen tunnistusaste	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Tämän yhdeksän ajon somaattisen tutkimuksen antamien tietojen perusteella NextSeq 550Dx -laite kykenee yhdenmukaisesti sekvensoimaan

- ▶ GC-sisällön, joka on  $\geq 19$  % (kaikki tunnistetut emäkset 378 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 19 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 2,6 %)
- ▶ GC-sisällön, joka on  $\leq 87$  % (kaikki tunnistetut emäkset 378 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 87 %:n GC-sisältö, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,6 %)
- ▶ PolyA-pituudet, jotka ovat  $\leq 9$  (kaikki tunnistetut emäkset 378 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on yhdeksän nukleotidin PolyA-toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 2,5 %)
- ▶ PolyT-pituudet, jotka ovat  $\leq 10$  (kaikki tunnistetut emäkset 378 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on kymmenen nukleotidin PolyT-toisto, tunnistettiin oikein alle 0,1 %:n ei-tunnistusten arvolla)
- ▶ PolyG-pituudet, jotka ovat  $\leq 6$  (kaikki tunnistetut emäkset 2268 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on kuuden nukleotidin PolyG-toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,5 %)
- ▶ PolyG-pituudet, jotka ovat  $\leq 6$  (kaikki tunnistetut emäkset 756 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on kuuden nukleotidin PolyC-toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,4 %)
- ▶ Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 4x$  (kaikki tunnistetut emäkset 1890 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 4x dinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein 0,9 %:n ei-tunnistusten arvolla)
- ▶ Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat  $\leq 5x$  (kaikki tunnistetut emäkset 378 sekvensoidulla amplikonilla, joissa on 5x trinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 1,4 %)
- ▶ Insertiopituudet, jotka ovat  $\leq 23$  (kaikki tunnistettu emäksiksi 378 sekvensoidussa amplikonissa, jotka sisältävät 23 nukleotidin insertion, joka tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,8 %)
- ▶ Deleetiopituudet, jotka ovat  $\leq 25$  (kaikki tunnistettu emäksiksi 1 134 sekvensoiduissa amplikoneissa, jotka sisältävät 25 nukleotidin deleetion, joka tunnistettiin oikein ei-tunnistusravolla 0,7%)

## Tarkkuus

NextSeq 550Dx -laite määritettiin testaamalla 13 yksilöllistä Platinum Genomen näytettä käyttämällä kolmea laitetta, kolmea reagenssierää ja kolmea operaattoria yhdeksän sekvensointiajon tuottamiseksi viiden aloituspäivän aikana. Edustava määritys, näytteet ja viitemenetelmä ovat samat kuin mitä ituradan tarkkuustutkimuksessa kuvaillaan. Tarkkuuskontribuutiot määritettiin varianssikomponenttianalysillä käyttäen VAF:ää vastemuuttujana ja laskemalla standardipoikkeamat osatasolla laitteelle, reagenssierälle, operaattorille ja aloituspäivälle (**Taulukko 19**). Laitteen kunkin osan, operaattorin ja reagenssierän analyysissa käytettyjen havainnointien kokonaismäärä oli 699, 176 ja 235 järjestyksessä SNV:ille, insertioille ja deleetioille.

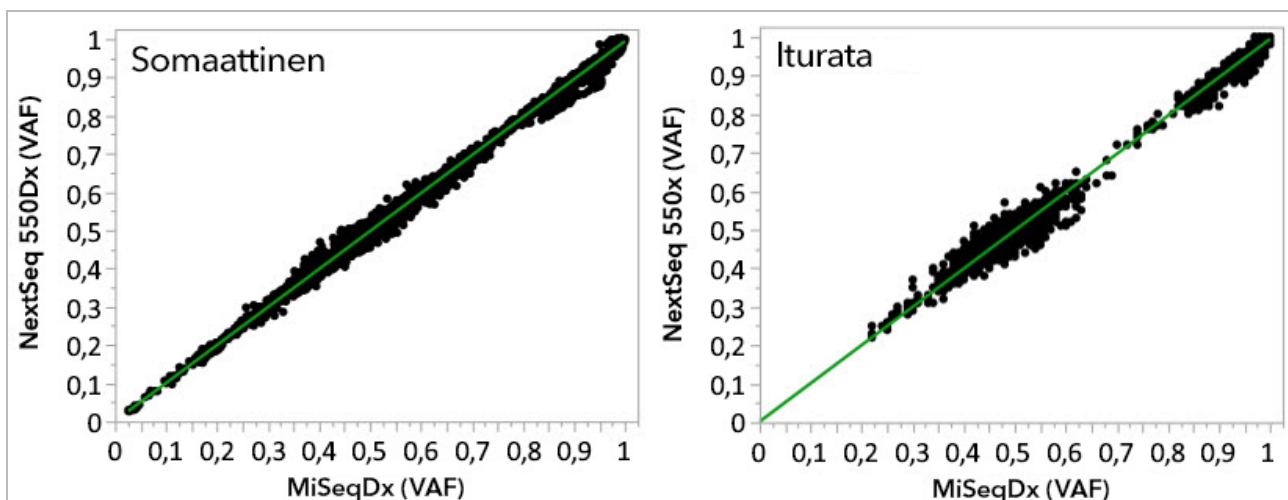
Taulukko 19 Tarkkuustulokset NextSeq 550Dx -laitteelle (standardipoikkeama, SD)

Osa	Varianttityyppi	Komponentin SD		SD yhteensä	
		Enimm.	Keskiarvo	Enimm.	Keskiarvo
Erä	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertio	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deleetio	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Laite	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertio	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deleetio	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operaattori	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertio	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deleetio	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Päivä	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertio	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deleetio	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Menetelmän vertailu (sekvensointialusta)

Kokoveri- ja FFPE-näytteet tutkittiin NextSeq 550Dx -laitteessa ja MiSeqDx -laitteessa käyttämällä TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:n iturata- ja somaattisia työnkulkuja. Varianttitaajuuden yhteneväisyys veri- ja FFPE-näytteille arvioitiin käyttämällä monia edustavia määryksiä. **Kuva 2** näkyy VAF-korrelaatio kahden laitteen välillä yhdelle edustavalle määrykselle, ja **Taulukko 20** annetaan yhteenveto tästä korrelaatiosta määrytyspaneelissa. MiSeqDx-laitteen ja NextSeq 550Dx -laitteen välisen vahvan korrelaation vuoksi suorituskykyominaisuudet, jotka liittyvät analytiikkaa edeltäviin tekijöihin (esim. eristämismenetelmät tai häiritsevät aineet) määritetään sopiviksi molempiin laitteisiin. Lue lisää TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:n pakkauselosteesta.

Kuva 2 VAF-korrelaatio MiSeqDx- ja NextSeq 550Dx -laitteisiin FFPE- (vasen) ja veri (oikea) näytteille määrytystä 1 käyttämällä



Taulukko 20 Menetelmän vertailutulokset käyttämällä yksilöllisiä veri- ja FFPE-näytteitä

gDNA:n lähde	Määrittys (oligopaneeli)	Biologiset replikaatit (näytteet)	Tekniset toistot (näytteelle)	Havainnot (varianttien lukumäärä)	Slope	Intercept	Korrelaatio (R <sup>2</sup> )
Veri	Määrittys 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Veri	Määrittys 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Määrittys 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Määrittys 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Kaksi tietokohtaa poistettiin ituratavarianttimoduulin ilmoitetun rajoituksen vuoksi.

<sup>2</sup>Determinaatiokerroin VAF-kuvioille kuvassa 2 näytetyllä tavalla.

## Toistettavuus

NextSeq 550Dx -laitteen toistettavuus arvioitiin käyttämällä Platinum Genome -näytteitä, joiden edustava määrittys on suunniteltu suorittamaan kysely laajasta geenivalikoimasta, johon kuuluu 12 588 emästä 23 eri kromosomissa käyttämällä 150 amplikonina. Ituratatestaukseen kuului seitsemän toistoa 13 näytteestä. Somaattiseen testaukseen kuuluu kuusi toistoa seitsemästä näytteestä eri VAF-tasoilla. Näytteet valmisteltiin käyttämällä TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää.

Testaus tehtiin kolmessa ulkoisessa paikassa käyttämällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjan v2 (300 jaksoa) yhtä erää. Kussakin paikassa käytettiin yhtä NextSeq 550Dx -laitetta. Kaksi operaattoria suoritti testauksen kussakin paikassa. Kukin toimija suoritti testauksen kolmena ei-peräkkäisenä aloituspäivänä kunkin näytetyypin kohdalla yhteensä 36 ajon verran kolmessa eri paikassa. Tämä testaus sai aikaan 18 ajoa kullekin iturata- ja somaattiselle työnkululle.

### Iturata

Ituratavariantit, joiden VAF-taso on  $\geq 0,2$ , ilmoitetaan positiivisina (variantti). Odotettujen positiivisten ituratavarianttien kohdalla tiedot arvioitiin ei-tunnistusasteella ja oikealla positiivisella tunnistusasteella kussakin varianttityypissä (SNV, insertio, deleetio). **Taulukko 21** annetaan yhteenveto havaituista asteista sekä alemman ja ylemmän 95 %:n luotettavuustasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilson Score -menetelmällä, kullekin varianttityypille.

Taulukko 21 Ituratatunnistuksen havainnointit odotettujen positiivisten tulosten varianttityypin perusteella

Varianttityyppi	Ei tunnistusta			Oikea positiivinen tunnistus				
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Insertiot	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Deleetiot	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Ituratavariantit, joiden VAF-taso on  $< 0,2$ , ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppisinä). Odotettujen negatiivisten ituratasijaintien tiedot arvioitiin ei-tunnistusten ja oikeiden wild-tyyppin tunnistusasteiden osilta. **Taulukko 22** annetaan yhteenveto havaituista asteista sekä alemman ja ylemmän 95 %:n luotettavuustasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilson Score -menetelmällä.

Taulukko 22 Odotettujen negatiivisten tulosten ituratatunnistuksen havainnointit

Varianttityyppi	Ei tunnistusta			Oikea negatiivinen tunnistus				
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
Wild-tyyppi	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Ituratavariantit, joiden VAF-taso on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , tunnistetaan variantin positiiviseksi heterotsygoottiseksi, ja variantit, joiden VAF-taso on  $\geq 0,7$ , tunnistetaan varianttien positiiviseksi homotsygoottiseksi. Ituratanäytteet, joissa on heterotsygoottisia variantteja, käytettiin määrittämään, vaikuttaako määrityksen synnynnäinen vaihtelu genotyyppiin tunnistukseen. Cx määritettiin molemmille raja-arvoille (0,2 heterotsygoottisille ja 0,7 homotsygoottisille genotyypeille), ja siinä x on raja-arvon ylittävien toistettujen testien osuus. Alemman raja-arvon 0,2 VAF kohdalla Cx oli  $\geq 99,999$  %, mikä osoittaa, että  $\geq 99,999$  prosenttia heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin heterotsygoottiseksi. Suhteessa ylempään raja-arvoon 0,7 VAF Cx oli  $\leq 0,001$  %, mikä ilmaisee, että  $\leq 0,001$  prosenttia heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin homotsygoottiseksi. **Taulukko 23** annetaan yhteenveto tuloksista varianttityypin perusteella.

Ituratavariantit, joiden VAF-taso on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , tunnistetaan variantin positiiviseksi heterotsygoottiseksi, ja variantit, joiden VAF-taso on  $\geq 0,7$ , tunnistetaan varianttien positiiviseksi homotsygoottiseksi. Ituratanäytteet, joissa on heterotsygoottisia variantteja, käytettiin määrittämään, vaikuttaako määrityksen synnynnäinen vaihtelu genotyyppiin tunnistukseen. Cx määritettiin molemmille raja-arvoille (0,2 heterotsygoottisille ja 0,7 homotsygoottisille genotyypeille), ja siinä x on raja-arvon ylittävien toistettujen testien osuus. Alemman raja-arvon 0,2 VAF kohdalla Cx oli  $\geq 99,999$  %, mikä näin ollen osoittaa, että  $\geq 99,999$  prosenttia heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin heterotsygoottiseksi. Suhteessa VAF:n ylempään raja-arvoon 0,7 Cx oli  $\leq 0,001$  %, mikä ilmaisee, että  $\leq 0,001$  prosenttia heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin homotsygoottiseksi. **Taulukko 23** annetaan yhteenveto tuloksista varianttityypin perusteella.

Taulukko 23 Ituradan Cx-arvot heterotsygoottisille varianteille

Varianttityyppi	Raja-arvo 0,2 VAF	Raja-arvo 0,7 VAF
	$\geq C99,999$ %	$\leq C0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Insertiot	24/24	24/24
Deleetiot	35/35	35/35
Yhteensä	153	153

### Somaattinen

Somaattiset variantit, joiden VAF-tasot ovat  $\geq 0,026$ , ilmoitetaan positiivisina (variantti). Havainnoiteja, joiden VAF-tasot olivat  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ , pidettiin epäselvinä tämän analyysin puitteissa (ei positiivisina eikä negatiivisina, merkitty alhaiseksi varianttitaajuudeksi). Suorituskyvyn arvioimiseksi tulokset laskettiin kolmella tavalla:

- ▶ Paras tapaus: Mahdollisia epäselviä tuloksia pidettiin oikeana positiivisena tunnistuksena (yhteneväisyys odotettujen tulosten kanssa)
- ▶ Pahin tapaus: Mahdollisia epäselviä tuloksia pidettiin virheellisenä tunnistuksena (erimielisyys odotettujen tulosten kanssa)
- ▶ Poissulkemisen tapaus: Kaikki epäselvät tulokset poissuljettiin analyysistä

Kolmessa taulukossa, **Taulukko 24**, **Taulukko 25** ja **Taulukko 26**, annetaan yhteenveto parhaan tapauksen, pahimman tapauksen ja poissulkemisen tapauksen tunnistuksen tuloksista sekä alemmat ja ylemmät 95 %:n luottamustasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilson Score -menetelmällä.

Taulukko 24 Somaattisen tunnistuksen havainnoinnit odotettujen positiivisten tulosten varianttityypin perusteella (paras tapaus)

Varianttityyppi	Oikea positiivinen tunnistus				
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertiot	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Deleetiot	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Taulukko 25 Somaattisen tunnistuksen havainnointit odotettujen positiivisten tulosten varianttityypin perusteella (huonoin tapaus)

Varianttityyppi	Oikea positiivinen tunnistus				
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertiot	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Deleetiot	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Taulukko 26 Somaattisen tunnistuksen havainnointit odotettujen positiivisten tulosten varianttityypin perusteella (epäselvät tunnistukset poistettu)

Varianttityyppi	Oikea positiivinen tunnistus				
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertiot	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Deleetiot	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somaattiset variantit, joiden VAF-taso on  $< 0,01$ , ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppisinä) tunnistuksina. Odotettujen negatiivisten somaattisten sijaintien tiedot arvioitiin ei-tunnistusasteen ja oikean wild-tyypin tunnistusasteen osilta. Oikeat wild-tyypin tunnistukset määritettiin poissulkemalla ei-tunnistukset ja vähentämällä havaitut tunnistukset, jotka olivat epäselviä (joiden VAF-tasot olivat  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ ), sekä virheelliset tunnistukset, jotka olivat raja-arvon yläpuolella (VAF-tasot  $\geq 0,026$ ) kokonaismäärästä. Taulukko 27 annetaan yhteenveto ei-tunnistusasteen ja oikean wild-tyyppisen tunnistusasteen negatiivisten somaattisten sijaintien havainnoista, kokonaismäärästä ja prosenttituloksista sekä alimman ja korkeimman 95 %:n ylä- ja alaluottamustasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilson Score -menetelmällä.

Taulukko 27 Odotettujen negatiivisten tulosten somaattisten tunnistuksen havainnointit

Varianttityyppi	Ei tunnistusta			Oikea tunnistus						
	Havaittu	Yhteensä	Prosentti	Epäselvä	Virheelinen	Oikea	Yhteensä	Prosentti	95 % LCL	95 % UCL
Wild-tyyppi	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Eri VAF-tasojen somaattiset näytteet samalle variantille arvioitiin määrityksen C95:n määrittämiseksi (kussakin varianttityypissä). Määrityksen raja-arvon lähellä olevan vaihtelun arvioimiseksi käytettiin näytteitä, joiden odotetut VAF-tasot olivat välillä 0,02–0,07. Kullekin variantille määritettiin C95, ja kunkin varianttityypin korkein C95 ilmoitettiin Taulukko 28.

Taulukko 28 Somaattisen C95:n yhteenveto

Varianttityyppi	N	C95
SNV	74	0,0613
Insertio	24	0,0573
Deleetio	33	0,0575

## NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) suorituskyky

### Yleiskatsaus

NextSeq 550Dx -laitetta tukee kaksi reagenssisarjaa: NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarja v2 (300 jaksoa) ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarja v2.5 (300 jaksoa). Sen osoittamiseksi, että NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarja v2.5 (300 jaksoa) kykenee täyttämään analyttiset suorituskykyvaatimukset, jotka on varmennettu ja vahvistettu NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa), tehtiin tutkimuksia NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2.5 (300 jaksoa). TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää käyttämällä suoritettiin kaksi kirjaston valmistelua: näistä yksi tehtiin ituratatyönkululla ja toinen somaattisella työnkululla. Kunkin työnkulun kirjastoja testattiin kolmella erällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa) käyttämällä kolmea NextSeq 550Dx -laitetta. Lisäksi kunkin työnkulun testaukseen kuului yksi ajo NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa).

### Analyttinen herkkyys (tyhjän raja [LoB] ja määrittelyn tunnistusraja [LoD])

Varmennus NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) osoitti, että NextSeq 550Dx -laite kykeni havaitsemaan variantteja tasolla 0,05 VAF tyyppin II virheen ollessa  $\leq 0,05$  ja että 0,026:n VAF-raja-arvo, jota somaattinen varianttimoduuli käytti (todellinen LoB), tukee tyyppin I virhettä, joka on  $\leq 0,01$ . Näiden väitteiden perusteella odotetaan, että variantti tasolla 0,05 VAF on suurempi tai yhtä suuri kuin 0,026 VAF 95 % ajasta ja että wild-tyypin sijainti on alle 0,026 VAF 99 % ajasta. Jotta voitiin varmistaa, että nämä väittämät toteutuvat NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjassa v2.5 (300 jaksoa), toistettuja mittauksia suoritettiin NextSeq 550Dx -laitteella wild-tyyppisillä näytteillä (LoB-näytteillä) ja näytteillä, jotka sisältävät variantteja tasolla 0,05 VAF (LoD-näytteet), käyttämällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa). Yllä olevien tunnistusten osuutta 0,026:n raja-arvon ylä- ja alapuolella verrattiin sitten väitteisiin, jotka koskevat NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2 (300 jaksoa).

Testaukseen kuului kaksi LoD-näytettä, joista kussakin on yksilöllinen varianttisarja, joka on kohdistettu 0,05:n VAF:iin, ja vastaavat LoB-näytteet, jotka olivat wild-tyypisiä kohdennetuille varianteille. Kirjaston valmistelua varten LoD- ja LoB-näytteet käsiteltiin seitsemän ja kahdeksan toistoissa järjestyksessä käyttämällä TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää. Kirjastot sekvensoitiin aluksi käyttämällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2 (300 jaksoa), jonka avulla tunnistetaan variantit/genomikoordinaatit LoB/LoD-arvioinnille NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2.5 (300 jaksoa). Kaikkia variantteja, joiden keskimääräinen VAF oli välillä 0,045–0,055 (LoD-variantit) NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2 (300 jaksoa) tulosten perusteella, käytettiin LoD-analyysissä (N = 51 varianttia). LoB-analyysissä arvioitiin 51 vastaavaa genomikoordinaattia.

NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) arvioinnissa kirjastot sekvensoitiin kolmessa ajossa kolmena peräkkäisenä päivänä käyttämällä samaa laitetta ja reagenssisarjaerää. Tässä testauksessa käytettiin 24 replikaattia kustakin 51 LoD-variantista ja 21 toistoa kustakin vastaavasta wild-tyyppisestä sijainnista. Wild-tyyppisten tunnistusten osuus VAF:in ollessa  $< 0,026$  on annettu [Taulukko 29](#). LoD-varianttunnistusten osuus, jossa VAF oli suurempi tai yhtä suuri kuin 0,026, on annettu [Taulukko 30](#).

Taulukko 29 Tunnistusten osuus  $< 0,026$  wild-tyyppisille sijainneille (LoB-väitteen arviointi)

Varianttityyppi	Arvioidut sijainnit	Havaintoja yhteensä	VAF-mittausten lukema $\geq 2,6$ %	Osuus $< 2,6$ %	Osuus 95 % Luottamusväli
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Insertio	11	231	0	1	0,984–1
Deleetio	8	168	0	1	0,978–1

Taulukko 30 Tunnistusten osuus  $\geq 0,026$  VAF LoD -varianteille (LoD -väitteen arviointi)

Varianttityyppi	Arvioidut sijainnit	Havaintoja yhteensä	VAF-mittausten lukema < 2,6 %	VAF-mittausten lukema $\geq 2,6$ %	Osuus $\geq 2,6$ %	Osuus 95 % Luottamusväli
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Insertio	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Deleetio	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

## Tarkkuus

### Iturata

Seuraava tutkimus suoritettiin variantin tunnistustarkkuuden arvioimiseksi ituratavarianttimoduulissa käyttäen NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa). Kaksitoista yksilöllistä Platinum Genomen näytettä testattiin käyttämällä edustavaa määritystä. Yhteensä 11 ajoa suoritettiin käyttämällä kolmea NextSeq 550Dx -laitetta ja kolmea NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa).

Tarkkuus määritettiin SNV:ille, insertioille ja deleetioille vertaamalla tuloksia hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään, Platinum Genomesin versioon 2016-1.0. Tarkkuustulokset yksittäisestä sekvensointiajosta NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) annetaan viitteeksi. Tulosten yhteenveto annetaan [Taulukko 31](#).

Taulukko 31 Yhteenveto ituratayhteneväisyydestä

Kriteerit	Havaintoja yhteensä (v2.5) <sup>1</sup>	Havaintokohtainen tulos (v2.5) <sup>2</sup>	Havaintokohtainen tulos (v2) <sup>3</sup>	Ajokohtainen tulos (v2.5) <sup>4</sup>	Ajokohtainen tulos (v2) <sup>4</sup>
PPA SNV:ille	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA insertioille	1056	100	100	100	98,9
PPA deleetioille	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>Laskettu näytelukuna ajoa kohden x ajojen lukumäärä (96 näytettä/ajo x 11 ajoa = 1056 havaintoa).

<sup>2</sup>Alin havaittu arvo näytetoistolla kaikissa ajoissa (perustuu 11 ajoon NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalle v2.5).

<sup>3</sup>Alhaisin havaittu arvo näytetereplikaatin perusteella 1 ajossa (yhteensä 96 havaintoa).

<sup>4</sup>Alhaisin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

### Somaattinen

Seuraava tutkimus suoritettiin variantin tunnistustarkkuuden arvioimiseksi NextSeq 550Dx laitteen somaattisessa varianttimoduulissa käyttäen NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa). Kymmenen Platinum Genomen FFPE-näytettä (joista kahden variantit on laimennettu 0,05 VAF:iin) testattiin edustavalla määrityksellä. Yhteensä 11 ajoa suoritettiin käyttämällä kolmea NextSeq 550Dx -laitetta ja kolmea NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) erää.

Tarkkuus määritettiin SNV:ille, insertioille ja deleetioille vertaamalla tuloksia hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään, Platinum Genomesin versioon 2016-1.0. Tarkkuustulokset yksittäisestä sekvensointiajosta NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) annetaan viitteeksi. Tulosten yhteenveto annetaan [Taulukko 32](#).



Taulukko 32 Yhteenvedo somaattisesta yhteneväisyydestä

Kriteerit	Havaintoja yhteensä (v2.5) <sup>1</sup>	Havaintokohtainen tulos (v2.5) <sup>2</sup>	Havaintokohtainen tulos (v2) <sup>3</sup>	Ajokohtainen tulos (v2.5) <sup>4</sup>	Ajokohtainen tulos (v2) <sup>4</sup>
PPA SNV:ille	528	100	100	100	100
PPA insertioille	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA deleetioille	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>Laskettu näytelukuna ajoa kohden x ajojen lukumäärä (48 näytettä/ajo x 11 ajoa = 528 havaintoa).

<sup>2</sup>Alin havaittu arvo näytetoistolla kaikissa ajoissa (perustuu 11 ajoon NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalle v2.5).

<sup>3</sup>Alhaisin havaittu arvo näytetripikaatin perusteella 1 ajossa (yhteensä 96 havaintoa).

<sup>4</sup>Alhaisin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

## Tarkkuus

### Iturata

NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) tarkkuus ituratavarianttimoduulin kanssa arvioitiin käyttämällä Platinum Genome -näytteitä ja edustavaa määritystä. Testaukseen kuului yhden kirjaston valmistelu käyttämällä TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää, ja siihen kuului 12 näytteen prosessointi siten, että kussakin oli kahdeksan replikaattia. Kirjastoja testattiin kolmella erällä NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa) käyttämällä kolmea NextSeq 550Dx -laitetta yhteensä yhdeksän sekvensointiajon verran.

Näytteet, joissa oli heterotsygoottisia variantteja, käytettiin määrittämään, vaikuttaako määrityksen synnynnäinen vaihtelu genotyyppin tunnistukseen (N = 153 yksilöllistä heterotsygoottista varianttia). Cx määritettiin molemmille ituratavarianttimoduulin raja-arvolle (0,2 heterotsygoottisille ja 0,7 homotsygoottisille genotyypeille), ja siinä x on raja-arvon ylittävien toistettujen testien osuus. Alemman raja-arvon 0,2 VAF kohdalla variantti, jolla oli vähimmäis-Cx NextSeq 550Dx -reagenssisarjalle v2.5 (300 jaksoa), oli > 99,9 %, mikä osoittaa, että > 99,9 % heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin heterotsygoottisiksi. Ylemmän raja-arvon 0,7 VAF kohdalla variantti, jolla oli enimmäis-Cx NextSeq 550Dx -reagenssisarjalle v2.5 (300 jaksoa), oli < 1,5 %, mikä osoittaa, että ≤ 1,5 % heterotsygoottisista varianteista tunnistettaisiin homotsygoottisiksi. **Taulukko 33** annetaan yhteenvedo tuloksista varianttityypin perusteella. Cx-arvot yksittäisestä sekvensointiajosta NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2 (300 jaksoa) käyttäen annetaan viitteeksi.

Taulukko 33 Ituradan Cx-arvot heterotsygoottisille varianteille

Varianttityyppi	N	Raja-arvo 0,2 VAF		Raja-arvo 0,7 VAF	
		Väh.-Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Väh.-Cx (v2) <sup>2</sup>	Enimm.-Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Enimm.-Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Insertiot	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Deleetiot	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

<sup>1</sup>Cx-arvot perustuvat kokonaissandardipikkeaman arviointeihin varianssikomponenttianalysista.

<sup>2</sup>Cx-arvot perustuvat näyttestandardipikkeamiin.

## Somaattinen

NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) tarkkuus somaattisen varianttimoduulin kanssa arvioitiin käyttämällä Platinum Genome FFPE -näytteitä ja edustavaa määritystä. Testaukseen kuului yhden kirjaston valmistelu käyttämällä TruSeq Custom Amplicon Kit Dx:ää, ja mukana oli kaksi näytettä, joissa kussakin oli kahdeksan replikaattia. Kirjastoja testattiin käyttämällä kolmea erää NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2.5 (300 jaksoa) kolmea NextSeq 550Dx -laitetta yhteensä yhdeksän sekvensointiajon verran.

Somaattisia variantteja, joiden odotetut VAF-tasot olivat  $\leq 0,10$  VAF (N = 131 yksilöllistä varianttia) käytettiin arvioimaan laitteen vaihtelua somaattisen varianttimoduulin VAF raja-arvon lähellä (somaattisia variantteja, joiden VAF-taso on  $\geq 0,026$ , kutsutaan variantin positiivisiksi). C95-arvot määritettiin kunkin somaattisen variantin osalta. C95-arvot edustavat VAF:ia, jonka kohdalla todennäköisyys sille, että se on suurempi kuin somaattisen varianttimoduuli VAF:n raja-arvo, on 95 %. Korkeimmat C95-arvot varianttityypeittäin on kerrottu [Taulukko 34](#). C95-tulokset yksittäisestä sekvensointiajosta NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaa v2 (300 jaksoa) käyttäen annetaan viitteeksi.

Taulukko 34 Somaattisen C95:n yhteenveto

Varianttityyppi	Arvioitujen varianttien määrä	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Insertiot	24	0,062	0,061
Deleetiot	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>C95-arvot perustuvat kokonaisstandardipoikkeaman arviointeihin varianssikomponenttianalysista.

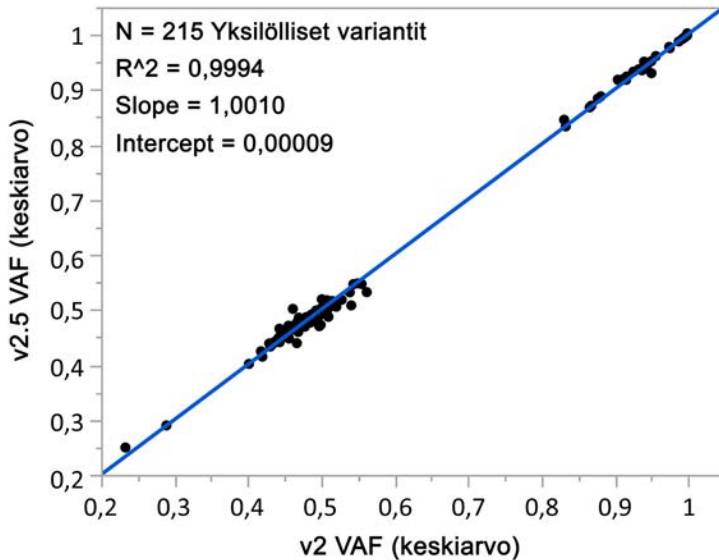
<sup>2</sup>C95-arvot perustuvat näyttestandardipoikkeamiin.

## Menetelmän vertailu (reagenssisarja)

### Iturata

Keskimääräiset VAF:it 215 yksilöllisestä variantista arvioitiin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2.5 (300 jaksoa) käyttämällä ituratavarianttimoduulilla tuotettuja tuloksia. VAF:n keskiarvot laskettiin 11 sekvensointiajosta (v2.5) ja yhdestä sekvensointiajosta (v2). Vähintään kahdeksaa toistoa käytettiin kunkin variantin keskiarvon laskemiseksi. [Kuva 3](#) näkyy VAF-korrelaatio kahden reagenssisarjan välillä. Vahvan lineaarisen VAF-korrelaation ja reagenssisarjojen välisten tulosten samankaltaisuuden perusteella suorituskykyominaisuudet, jotka aluksi varmennettiin ja vahvistettiin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) ituratavarianttimoduulissa, määritetään sovellettaviksi NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaan v2.5 (300 jaksoa).

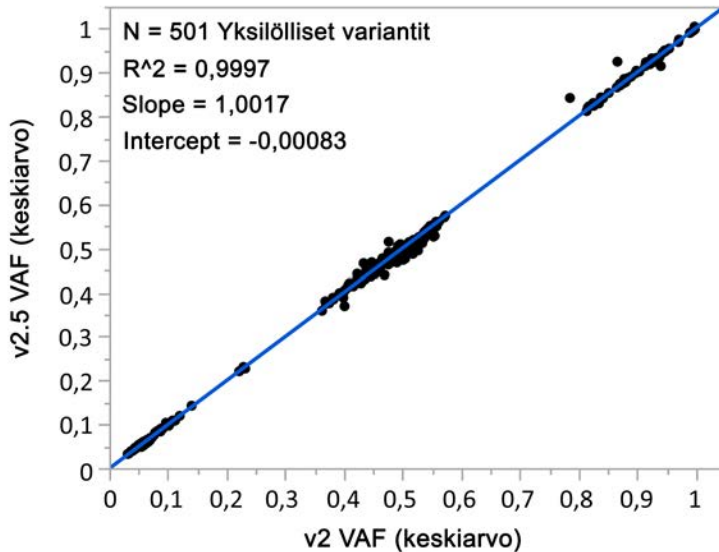
Kuva 3 Ituratavarianttimoduulin varianttialleelin taajuuden (VAF) korrelaatio NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2 (300 jaksoa) ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjan v2.5 (300 jaksoa) väillä.



### Somaattinen

Keskimääräiset VAF:t 501 yksilöllisestä variantista arvioitiin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2.5 (300 jaksoa) käyttämällä somaattisella varianttimoduulilla tuotettuja tuloksia. VAF:n keskiarvot laskettiin 11 sekvensointiajosta (v2.5) ja yhdestä sekvensointiajosta (v2). Vähintään kolmea replikaattia käytettiin kunkin yksilöllisen variantin keskiarvon laskemiseksi. [Kuva 4](#) näkyy VAF-korrelaatio kahden reagenssisarjan välillä. VAF-korrelaation ja reagenssisarjojen välisten tulosten samankaltaisuuden perusteella suorituskykyominaisuudet, jotka varmennettiin ja vahvistettiin NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjalla v2 (300 jaksoa) somaattisessa varianttimoduulissa, määritetään sovellettaviksi NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssisarjaan v2.5 (300 jaksoa).

Kuva 4 Somaattisen varianttimoduulin varianttialleelin taajuuden (VAF) korrelaatio NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjan v2 (300 jaksoa) ja NextSeq 550Dx -suurtehoreagenssarjan v2.5 (300 jaksoa) väliillä.



## Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patenti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

**MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.**

**ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).**

© 2021 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Yhteystiedot



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1 800 809.ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

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

## Tuotteiden merkinnät

Katso tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset osoitteesta [support.illumina.com](mailto:support.illumina.com) käyttämäsi sarjan välilehdeltä *Documentation and Literature* (Dokumentaatio ja kirjallisuus).