

# Instrument extSeq™ 550Dx

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU

SAMO ZA IZVOZ

Kataloški broj 20005715

## Namjena

Instrument NextSeq 550Dx namijenjen je sekvenciranju biblioteka DNA za upotrebu s dijagnostičkim analizama *in vitro*. Instrument NextSeq 550Dx mora se upotrebljavati s određenim registriranim, certificiranim ili odobrenim dijagnostičkim reagensima *in vitro* i analitičkim softverom.

## Načela postupka

Instrument Illumina NextSeq 550Dx namijenjen je sekvenciranju biblioteka DNA dijagnostičkim analizama *in vitro*. NextSeq 550Dx kao ulaz upotrebljava biblioteke generirane iz DNA kod kojih se amplificiranim ciljnim vrijednostima dodaju indeksi uzorka i prikupljene sekvence. Biblioteke uzoraka izrađuju se na protočnoj jedinici i sekvenciraju na instrumentu pomoću kemijskog postupka sekvenciranja sintezom (SBS). Kemijski postupak SBS upotrebljava metodu reverzibilnog terminatora za otkrivanje fluorescentno označenih baza s jednim nukleotidom dok se oni umeću u rastuće DNA lance. Softver Real-Time Analysis (RTA) analizira slike i otkriva baze te svakoj bazi za svaki ciklus sekvenciranja dodjeljuje ocjenu kvalitete. Po dovršetku primarne analize na instrumentu se može izvesti sekundarna analiza radi obrade otkrivanja baza. NextSeq 550Dx upotrebljava različite module za sekundarnu analizu, ovisno o tijeku rada. Za module Germline ili Somatic Variant obrada uključuje demultipleksiranje, generiranje datoteka FASTQ, usklađivanje, otkrivanje varijanti i generiranje datoteka u formatu za otkrivanje varijanti (VCF i gVCF). Datoteke VCF i gVCF sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim mjestima u referentnom genomu.

## Konfiguracija dva načina podizanja sustava

NextSeq 550Dx omogućuje konfiguraciju dva načina podizanja sustava kako bi se omogućila upotreba instrumenta u dijagnostičkom (Dx) ili isključivo istraživačkom načinu rada (RUO). Analize za sekvenciranje za *in vitro* dijagnostiku, uključujući module Germline i Somatic Variant, izvršavaju se u dijagnostičkom načinu rada. U dijagnostičkom se načinu rada mogu upotrebljavati samo reagensi za sekvenciranje za IVD. Karakteristike radnih svojstava i ograničenja postupka za instrument NextSeq 550Dx utvrđene su pomoću modula Germline i Somatic Variant u dijagnostičkom načinu rada

## Ograničenja postupka

- 1 Za *in vitro* dijagnostiku.
- 2 Kad se moduli Germline i Somatic Variant upotrebljavaju s kompletima NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) ili NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa), oni mogu dati sljedeće:
  - ▶ izlazni rezultat sekvenciranja  $\geq 90$  gigabaza (Gb)
  - ▶ dužina očitavanja (u obradi s uparenim krajevima) 2 x 150 parova baza (bp)
  - ▶ baze jednake ili veće od Q30  $\geq 75$  % pri dužini očitavanja od 2 x 150 bp;  
baze jednake ili veće od 75 % imaju ocjene kvalitete na ljestvici Phred  $\geq 30$ , što ukazuje na točnost otkrivanja baza veću od 99,9 %

- 3 Očitavanja s indelima (umetanjima, delecijama ili kombinacijama) kod kojih je dužina sadržaja > 25 bp nisu u skladu sa softverom za analizu. Zbog toga softver za analizu ne može detektirati čitanja duljine > 25 bp.
- 4 Softver za analizu možda neće uskladiti očitavanja amplicona koja sadrže ekstremne varijante, što znači da će to područje biti prepoznato kao populacija divljeg tipa. Ekstremni sadržaj obuhvaća sjedeće:
  - ▶ očitavanja koja sadrže više od tri promjene genetskog koda
  - ▶ očitavanja duljine najmanje 30 bp sa sadržajem varijante s jednim nukleotidom (SNV) > 4 % od ukupne ciljane duljine amplicona (bez regija sonde)
  - ▶ očitavanja duljine < 30 bp sa sadržajem SNV-a > 10 % od ukupne ciljane duljine amplicona (s regijama sonde)
- 5 Velike varijante, uključujući one višenukleotidne (multinucleotide variant, MNV) i velike indele, možda će u izlaznoj VCF datoteci biti prepoznate kao zasebne manje varijante.
- 6 Varijante brisanja moguće je filtrirati ili propustiti kada se prostiru duž amplicona s dvije površine ako je duljina brisanja veća od preklapanja između amplicona s više površina ili pak jednaka njemu.
- 7 Sustav ne može detektirati promjene u genetskom kodu ako se javljaju odmah uz primer i ako nema preklapajućih amplicona. U slučaju regija s preklapajućim ampliconima, analiza ne može detektirati brisanja kada je regija preklapanja manja od veličine brisanja koje je potrebno detektirati. Tako, primjerice, ako su regija preklapanja između dva susjedna amplicona dvije baze, analiza neće detektirati brisanja koja obuhvaćaju te dvije baze. Brisanje jedne od tih baza moguće je detektirati.
- 8 Kao i u svakom drugom tijeku rada pripreme biblioteke utemeljene na hibridizaciji, pozadinski polimorfizmi, mutacije, umetanja ili brisanja na području regija koje vežu oligonukleotide mogu utjecati na ispitivanje alela i odluke donesene tijekom sekvenciranja. Na primjer:
  - ▶ Varijanta u fazi s varijantom u području primera možda neće biti pojačana, što će rezultirati lažno negativnim rezultatom.
  - ▶ Varijante u regiji primera mogu spriječiti pojačanje referentnog alela, što rezultira netočno homozigotnim oblikom varijante.
  - ▶ Varijante promjena genetskog koda u regiji primera mogu uzrokovati lažno pozitivan rezultat pri kraju čitanja u blizini primera.
- 9 Promjene genetskog koda moguće je filtrirati zahvaljujući toleranciji lanca koja se javlja pri kraju jednog čitanja, zbog čega se one tijekom poravnanja ignoriraju.
- 10 Mali MNV-ovi nisu validirani i prijavljuju se samo u modulu somatskih varijanti.
- 11 Brisanja se prijavljuju u VCF-u na koordinatama prethodne baze u skladu s VCF formatom. Stoga prije nego što to prepoznate pojedinačno otkrivanje baze kao homozigotnu referencu, razmotrite radi li se o susjednim varijantama.
- 12 Ograničenja specifična za zametne stanice:
  - ▶ Instrument NextSeq 550Dx pomoću modula varijanti zametnih stanica softvera Local Run Manager za NextSeq 550Dx dizajniran je da pruži kvalitativne rezultate za određivanje varijanti zametnih stanica (npr. homozigotna, heterozigotna, divlja populacija).
  - ▶ Kad se upotrebljava s modulom Germline Variant Module, minimalna pokrivenost po ampliconu potrebna za točno prepoznavanje varijante iznosi 150x. Kao rezultat potrebno je 150 fragmenata DNK, što je jednako 300 očitavanja s preklapajućim uparenim krajevima. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utječu na pokrivenost. Na pokrivenost mogu utjecati sadržaj GC i drugi genomski sadržaj.
  - ▶ Kopiranje broja varijanti može utjecati na to hoće li varijanta biti prepoznata kao homozigotna ili heterozigotna.
  - ▶ Varijante se u određenim ponavljajućim kontekstima filtriraju iz VCF datoteka. Filtar za ponavljanja RMxN upotrebljava se za filtriranje varijanti ako se cijela sekvenca varijante ili njen dio ponavljaju u referentnom genomu uz položaj varijante. Za otkrivanje varijanti spolnih stanica potrebno je najmanje devet ponavljanja u referenci da bi se varijanta filtrirala. Uzimaju se u obzir samo ponavljanja dužine do 5 bp (R5x9).

- ▶ Promjena genetskog sadržaja i SNV na jednom lokusu mogu rezultirati prijavljivanjem samo jedne varijante.
- 13 Ograničenja specifična za somatske varijante.
- ▶ Instrument NextSeq 550Dx uz upotrebu modula Somatic Variant Module iz Local Run Managera za NextSeq 550Dx namijenjen je dobivanju kvantitativnih rezultata za otkrivanje somatskih varijanti (tj. otkrivanje prisutnosti somatskih varijanti s učestalošću varijante jednakom ili većom od 0,026 uz granicu dokazivanja od 0,05).
  - ▶ Kad se upotrebljava s modulom Somatic Variant Module, minimalna pokrivenost po ampliconu potrebna za točno prepoznavanje varijante iznosi 450x po skupini oligonukleotida. Stoga je potrebno 450 potpornih DNA fragmenata po skupini oligonukleotida, što odgovara brojcima od 900 čitanja s uparenim krajevima koja se preklapaju. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utječu na pokrivenost. Na pokrivenost mogu utjecati sadržaj GC i drugi genomski sadržaj.
  - ▶ Pri određivanju varijanti somatskih stanica za filtriranje varijante potrebno je najmanje šest ponavljanja u referentnom sadržaju, a u obzir se uzimaju samo ponavljanja s najviše 3 bp (R3x6).
  - ▶ Modul somatske varijante ne može razlikovati varijante zametne stanice od somatskih varijanti. Modul je namijenjen prepoznavanju varijanti u rasponu učestalosti varijanti, ali se učestalost varijanti ne može upotrebljavati za razlikovanje somatskih varijanti od varijanti linija spolnih stanica.
  - ▶ Normalno tkivo uzorka utječe na detekciju varijanti. Otkriveno ograničenje prepoznavanja temelji se na učestalosti varijante u odnosu na ukupnu DNA izdvojenu iz tumora i normalnog tkiva.

## Komponente proizvoda

- 1 Instrumenta NextSeq 550Dx (kataloški broj 20005715)
- 2 Softverskih komponenti za instrument NextSeq 550Dx, uključujući sljedeće:

Softverska aplikacija	Funkcija	Opis
Operacijski softver instrumenta NextSeq 550Dx (NOS)	Kontrolira rad instrumenta	Softverska aplikacija NOS upravlja radom instrumenta tijekom sekvenciranja i generira slike koje upotrebljava softver Real-Time Analysis (RTA).
Softver Real-time Analysis (RTA)	Izvodi primarnu analizu	Softverska aplikacija RTA pretvara slike koje generira NOS za svaki kvadratić u ciklusu obrade sekvenciranjem u datoteke za otkrivanje baza koje su ulazni podaci modulima za analizu komponente Local Run Manager. Softverska aplikacija RTA nema korisničko sučelje.
Local Run Manager	Sučelje za odabir modula	Softver Local Run Manager integrirano je rješenje na samom instrumentu za upravljanje korisnicima, odabir odgovarajućeg modula za analizu i nadzor stanja.
Somatic Variant Module	Izvodi sekundarnu analizu	Ovaj softverski modul za analizu komponente Local Run Manager obrađuje otkrivanja baza putem sekundarne analize. Ta obrada obuhvaća demultipleksiranje, generiranje datoteke FASTQ, uspoređivanje, otkrivanje varijanti i izvješćivanje. Alat za otkrivanje varijanti (Pisces) generira VCF datoteke koje sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim položajima u referentnom genomu i obuhvaća izmjerenu učestalost varijanti.
Germline Variant Module	Izvodi sekundarnu analizu	Ovaj softverski modul za analizu komponente Local Run Manager obrađuje otkrivanja baza putem sekundarne analize. Ta obrada obuhvaća demultipleksiranje, generiranje datoteke FASTQ, uspoređivanje, otkrivanje varijanti i izvješćivanje. Alat za otkrivanje varijanti (Pisces) generira VCF datoteke koje sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim položajima u referentnom genomu i identificira svaku varijantu kao heterozigotnu ili homozigotnu.

## Radni uvjeti

Element	Specifikacija
Temperatura	Temperaturu u laboratoriju održavajte između 19 °C i 25 °C (22 °C ± 3 °C). Ta je temperatura radna temperatura instrumenta. Tijekom analize nemojte dopustiti da temperatura okruženja mijenja vrijednost za više od ±2 °C.
Vlažnost	Nekondenzirajuću relativnu vlažnost održavajte između 20 % i 80 %.

## Oprema i materijal

### Potrebna oprema i materijali, prodaju se zasebno

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa), kataloški broj 20019554

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa), kataloški broj 20028871

### Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

#### Potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik za analize sekvenciranja

Potrošni materijal	Dobavljač	Svrha
Alkoholne maramice sa 70 % izopropila ili 70 % etanola	VWR, kataloški broj 95041-714 (ili ekvivalent) Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora	Čišćenje protočne jedinice i općenita namjena
Laboratorijske maramice koje ne ispuštaju mnogo dlačica	VWR, kataloški broj 21905-026 (ili ekvivalent)	Čišćenje protočne jedinice i opća namjena

#### Potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik za održavanje instrumenta

Potrošni materijal	Dobavljač	Svrha
NaOCl, 5 % (natrijev hipoklorit)	Sigma-Aldrich, kat. broj 239305 (ili ekvivalentni proizvod laboratorijske kvalitete)	Pranje instrumenta pomoću ručnog ispiranja nakon obrade; razrijeđeno na 0,12-postotnu otopinu
Tween 20	Sigma-Aldrich, kataloški broj P7949	Pranje instrumenta pomoću mogućnosti ručnog pranja; razrijeđeno na 0,05-postotnu otopinu
Voda, laboratorijske kvalitete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora	Pranje instrumenta (ručno pranje)
Filtar za zrak	Illumina, kat. broj 20022240	Čišćenje zraka koji instrument uzima radi hlađenja

#### Smjernice za vodu laboratorijske kvalitete

Za postupke na instrumentu uvijek upotrebljavajte vodu ili deioniziranu vodu laboratorijske kvalitete. Nipošto nemojte koristiti vodu iz slavine. Koristite samo sljedeće razrede vode ili njihove ekvivalente:

- ▶ deionizirana voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ voda od 18 megaoma (MΩ)
- ▶ voda Milli-Q

- ▶ voda Super-Q
- ▶ voda za primjenu u molekularnoj biologiji

## Upozorenja i mjere opreza



### OPREZ

Savezni zakon propisuje da ovaj proizvod mogu prodavati samo liječnici ili drugi stručnjaci koje je licencirala država u kojoj oni djeluju te da se proizvod može prodavati samo na njihov recept za upotrebu ili propisanu upotrebu proizvoda.

- 1 **Neke komponente reagensa koje nudi Illumina za upotrebu s instrumentom NextSeq 550Dx sadrže potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja, dodira s kožom i dodira s očima može doći do ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima.** Da biste saznali više o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti, pročitajte Sigurnosno tehničke listove (SDS-ove) na web-mjestu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Svim uzorcima krvi rukujte kao da je poznata njihova inficiranost virusom humane imunodeficiencije (HIV), virusom humanog hepatitisa B (HBV) i drugim patogenim tvarima koji se prenose krvlju (univerzalne mjere opreza).
- 3 Nepridržavanje navedenih procedura može rezultirati netočnim rezultatima ili znatnim smanjenjem kvalitete uzoraka.
- 4 Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Kad rukujete uzorcima i kompletima reagensa, koristite se rukavicama za jednokratnu upotrebu i laboratorijskim kutama. Nakon rukovanja uzorcima i kompletima reagensa temeljito operite ruke.
- 5 Obavezno je slijeđenje ispravnih praksi i dobre higijene u laboratorijima da bi se spriječila kontaminacija reagensa, instrumentacije i genomski uzoraka DNA PCR proizvodima. Kontaminacija PCR-a može uzrokovati netočne i nepouzdanе rezultate.
- 6 Da biste spriječili kontaminaciju, pripazite da se u područjima prije amplifikacije i poslije amplifikacije upotrebljava namjenska oprema i potrošni materijal (npr. pipete, vrhovi pipeta, blokovi za zagrijavanje, vrtložne miješalice i centrifuge).
- 7 Uparivanje indeksa s uzorkom mora se točno podudarati s otisnutim rasporedom na pločici. Local Run Manager automatski popunjava primere za indeksiranje povezane s nazivima uzoraka kad se umetnu u modul. Korisniku se savjetuje da prije pokretanja obrade sekvenciranjem provjeri primere za indeksiranje povezane s uzorcima. Nepodudaranja između uzoraka i rasporeda na pločici dovodi do nemogućnosti pozitivne identifikacija uzorka i dobivanja netočnih rezultata.
- 8 Toplo se preporučuje instalacija antivirusnog softvera prema odabiru korisnika radi zaštite računala od virusa. Upute za instalaciju potražite u korisničkom priručniku.
- 9 Nemojte rukovati instrumentom NextSeq 550Dx s uklonjenom bilo kojom pločicom. Rukovanje instrumentom s uklonjenom bilo kojom pločom predstavlja opasnost od izlaganja naponu električne mreže ili naponu istosmjerne struje.
- 10 Ne dodirujte postolje za protočnu jedinicu u odjeljku s protočnom jedinicom. Grijač u tom odjeljku funkcionira na temperaturi između 22 °C i 95 °C te može uzrokovati opekline.
- 11 Masa instrumenta je oko 84 kg. i može uzrokovati teške ozljede u slučaju pada ili krivog rukovanja.

## Upute za upotrebu

Sljedeće upute za upotrebu tiču se korištenja modula Germline i Somatic Variant u dijagnostičkom načinu rada na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) ili NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).

## Unos podataka o obradi

Detaljne upute potražite u Referentnom vodiču za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta: 100000009513) i primjenjivom vodiču za modul Local Run Manager.

### Postavljanje parametara

- 1 Prijavite se u Local Run Manager.
- 2 Odaberite **Create Run** (Stvori obradu) pa **Somatic Variant** ili **Germline Variant**.
- 3 Unesite naziv obrade po kojem ćete razlikovati obradu od sekvenciranja preko analize. Pritom upotrijebite alfanumeričke znakove, razmake, podvlake ili crtice.
- 4 **[neobavezno]** Unesite opis obrade da biste je lakše razlikovali. Pritom upotrijebite alfanumeričke znakove, razmake, podvlake ili crtice.
- 5 Na padajućem popisu odaberite broj uzoraka i skup indeksa. Prilikom odabira uzmite u obzir sljedeće informacije:
  - ▶ Padajući popis sadrži brojeve uzoraka sa skupom indeksa. Primjerice, 24-Set 1 znači da će se testirati 24 uzorka s indeksima iz skupa indeksa 1.
  - ▶ Brojevi skupova indeksa odnose se na različite skupove parova indeksa i5 i i7. Skup 1 i skup 2 omogućuju raznolikost indeksa. Ponuđena su dva skupa indeksa kako bi se spriječilo iscrpljivanje jednog skupa.
  - ▶ Odaberite broj uzoraka koji je najbliži broju uzoraka koji testirate. Ako točan broj uzoraka nije na popisu, odaberite broj koji je najbliži ali manji od broja koji testirate. Primjerice, ako želite testirati 18 uzoraka, odaberite 16 uzoraka.
  - ▶ Predložene jažice s uzorcima i kombinacije indeksa koje zadovoljavaju preduvjete raznolikosti indeksa označene su zelenom bojom.

### Uvoz datoteka manifesta za obradu

- 1 Pazite da manifesti koje želite uvesti budu dostupni na pristupačnoj mrežnoj lokaciji ili na USB pogonu.
- 2 Odaberite **Import Manifests** (Uvezi manifeste).
- 3 Idite na datoteku manifesta i odaberite manifest koji želite dodati.



#### NAPOMENA

Da biste datoteke manifesta učinili dostupnima svim obradama uz upotrebu modula za analizu Germline Variant ili Somatic Variant, manifeste dodajte pomoću značajke Module Settings (Postavke modula). Ta značajka zahtijeva dozvole za korisničku razinu administratora. Da biste saznali više, pročitajte *Referentni priručnik za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta: 100000009513)*.


### Navođenje uzoraka za obradu

Navedite uzorke za obradu pomoću jedne od mogućnosti i sljedećih smjernica.


- ▶ **Ručni unos uzoraka** – upotrijebite praznu tablicu na zaslonu Create Run (Stvori obradu).
- ▶ **Uvoz uzoraka** – otvorite vanjsku datoteku u formatu vrijednosti odvojenih zarezom (\*.csv). Moguće je preuzeti predložak na zaslonu Create Run (Stvori obradu).

### Ručni unos uzoraka

- 1 Unesite jedinstveni naziv uzorka (**modul za analizu Somatic Variant**) ili ID uzorka (**modul za analizu Germline Variant**). Pritom upotrebite alfanumeričke znakove, crtice ili podvlake.
- 2 **[neobavezno]** Za pozitivne ili negativne kontrolne uzorke desnom tipkom miša kliknite i odaberite vrstu kontrole. Kontrola u jednoj jažici s uzorkom automatski se upisuje na odgovarajuće mjesto s istom kontrolom u drugoj skupini.
- 3 **[neobavezno]** U polje Sample Description (Opis uzorka) unesite opis uzorka.

- Pritom upotrebljavajte alfanumeričke znakove, crtice ili podvlake.
- 4 Odaberite prilagodnik Indeks 1 na padajućem popisu Index 1 (i7).  
Kad upotrebljavate predložene jažice za uzorke, softver automatski popunjava prilagodnike indeksa i7 i i5 koji zadovoljavaju preduvjete različitosti za indekse. Ako točan broj uzoraka koji testirate nije na popisu, pripazite da odaberete prilagodnike indeksa za dodatne jažice.
  - 5 Odaberite prilagodnik Indeks 2 na padajućem popisu Index 2 (i5).
  - 6 Odaberite datoteku manifesta na padajućem popisu manifesta.  
Uzorci iz skupine A zahtijevaju različit manifest od uzoraka iz skupine B.
  - 7 Odaberite mogućnost za prikaz, ispis ili spremanje rasporeda pločice kao referencu za pripremu biblioteka:
    - Odaberite ikonu  **Print** (Ispis) da biste prikazali raspored pločice. Odaberite **Print** (Ispis) da biste ispisali raspored pločice.
    - Odaberite **Export** (Izvezi) da biste izvezli podatke o uzorku u vanjsku datoteku.
  - 8 Odaberite **Save Run** (Spremi obradu).

#### Uvoz uzoraka

- 1 Odaberite **Import Samples** (Uvezi uzorke) i idite na mjesto na kojem se nalazi datoteka s podacima o uzorku. Možete uvesti dvije vrste datoteka.
  - Na zaslону Create Run (Stvori obradu) odaberite **Template** (Predložak) da biste napravili novi raspored pločice. Datoteka predložka sadrži točna zaglavlja stupaca za uvoz. U svaki stupac unesite podatke o uzorku za uzorke u obradi. Izbrišite primjere podataka u člancima koji se ne upotrebljavaju, a zatim spremite datoteku.
  - Upotrijebite datoteku s podacima o uzorcima izvezenu iz modula Germline Variant ili Somatic Variant pomoću značajke izvoza.
- 2 Odaberite ikonu  **Print** (Ispis) da biste prikazali raspored pločice.
- 3 Odaberite **Print** (Ispis) da biste ispisali raspored pločice kao referencu za pripremu biblioteka.
- 4 Odaberite **Save Run** (Spremi obradu).

## Priprema spremnika reagensa

Pripazite da pažljivo slijedite smjernice povezane sa spremnikom reagensa da bi sekvenciranje bilo uspješno.

- 1 Izvadite spremnik reagensa iz spremišta u kojem je temperatura od -25 °C do -15 °C.
- 2 Odaberite neku od sljedećih metoda otapanja reagensa. Nemojte uranjati spremnik u tekućinu. Nakon otapanja spremnika osušite ga prije prelaska na sljedeći korak.

Temperatura	Vrijeme odmrzavanja	Granica stabilnosti
vodena kupelj temperature od 15 °C do 30 °C	60 minuta	Ne smije premašiti 6 sati
od 2 °C do 8 °C	7 sati	Ne smije premašiti 5 dana



#### NAPOMENA

Ako se u istoj vodenoj kupelji odmrzava više spremnika, vrijeme odmrzavanja se produžuje.

- 3 Preokrenite spremnik pet puta da biste promiješali reagens.
- 4 Pregledajte dno spremnika da biste se uvjerali da su reagensi otopljeni i ne sadrže talog. Provjerite da su položaji 29, 30, 31 i 32 otopljeni jer su oni najveći i treba im najviše vremena da se otope.
- 5 Nježno lupnite o stol da biste smanjili broj mjehurića zraka.  
Da biste postigli najbolje rezultate, odmah umetnite uzorak i postavite obradu.

## Priprema protočne jedinice

- 1 Izvadite kutiju s novom protočnom jedinicom iz skladišta u kojem je temperatura između 2 °C i 8 °C.
- 2 Izvadite pakiranje s folijom iz kutije i odložite 30 minuta na sobnoj temperaturi.

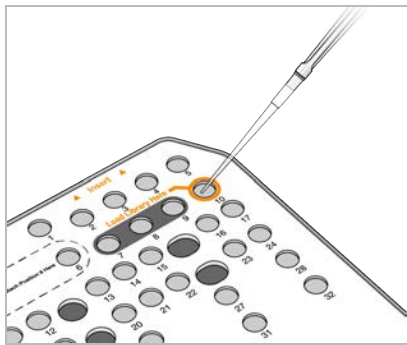
## Priprema biblioteka za sekvenciranje

Denaturirajte i razrijedite biblioteke na ulazni volumen od 1,3 ml. U praksi ulazna koncentracija može se razlikovati ovisno o pripremi biblioteke i metodama kvantifikacije. Razrjeđivanje biblioteka uzoraka ovisi o složenosti oligonukleotidnih skupova. Upute za pripremu biblioteka uzoraka za sekvenciranje, uključujući razrjeđivanje biblioteka i stvaranje skupova, potražite u odjeljku Upute za upotrebu primjenjivog kompleta za pripremu biblioteka. Nužna je optimizacija gustoće klastera na instrumentu NextSeq 550Dx.

## Umetanje biblioteka u spremnik reagensa

- 1 Očistite zaštitnu foliju koja prekriva spremnik br. 10 s oznakom **Load Library Here** (Ovdje umetnite biblioteku) krpicom koja ne ostavlja vlakna.
- 2 Probušite foliju čistim vrhom pipete od 1 ml.
- 3 Umetnite 1,3 ml pripremljenih biblioteka u spremnik br. 10 označen s „**Load Library Here**“ (Ovdje umetnite biblioteku). Izbjegavajte dodirivanje zaštitne folije prilikom pipetiranja biblioteka.

Sl. 1 Umetanje biblioteka



## Postavljanje obrade sekvenciranjem

- 1 Prijavite se na sustav NextSeq 550Dx koristeći se lozinkom za softver Local Run Manager.
- 2 Na početnom zaslonu softvera NOS odaberite **Sequence** (Sekvenciraj).
- 3 Na popisu odaberite obradu pa **Next** (Dalje).  
Otvora se niz zaslona za postavljanje obrade sljedećim redoslijedom: Load Flow Cell (Umetanje protočne jedinice), Load Buffer Cartridge (Umetanje spremnika pufera), Load Reagent Cartridge (Umetanje spremnika reagensa) i Pre-run Check (Provjera prije obrade).
- 4 Kad se prikaže zaslon Load Flow Cell (Umetanje protočne jedinice), očistite i umetnite protočnu jedinicu.
  - ▶ Izvadite protočnu jedinicu iz folije u koju je zapakirana.
  - ▶ Otvorite pakiranje od prozirne plastike i izvadite protočnu jedinicu.
  - ▶ Očistite staklenu površinu protočne jedinice alkoholnom maramicom koja ne ostavlja vlakna. Staklo osušite laboratorijskom krpicom koja ne ostavlja vlakna.
  - ▶ Staklena površina protočne jedinice mora biti čista. Ako je potrebno, ponovite korak čišćenja.
  - ▶ Uklonite iskorištenu protočnu jedinicu iz prethodne obrade.
  - ▶ Poravnajte protočnu jedinicu koristeći se zaticima za poravnavanje i postavite ju na postolje.
- 5 Odaberite **Load** (Umetanje).  
Vrata se automatski zatvaraju: ID protočne jedinice pojavljuje se na zaslonu te se provjeravaju senzori.
- 6 Slijedite upite softvera da biste ispraznili potrošeni spremnik reagensa, umetnuli spremnik pufera za NextSeq 550Dx i umetnuli spremnik reagensa za NextSeq 550Dx.  
Kad su umetnuti spremnik pufera i reagensa za NextSeq 550Dx, softver očitava i zapisuje RFID. ID-ovi spremnika pufera i reagensa pojavljuju se na zaslonu čime su provjereni senzori.



- 7 Kad završi automatska provjera prije obrade, odaberite **Start** (Pokreni) (nije obavezno ako je konfigurirano automatsko pokretanje).
- 8 Kad započne obrada, otvara se zaslon Sequencing (Sekvenciranje). Na tom se zaslonu nalazi vizualni prikaz obrade u tijeku, uključujući i intenzitete i rezultate kvalitete (Q-ocjene).

## Rezultati

Real-Time Analysis (RTA) integrirani je softver koji analizira slike, otkriva baze i dodjeljuje ocjenu kvalitete svakoj bazi u svakom ciklusu sekvenciranja. Kad se dovrši primarna analiza, odabrani modul Local Run Manager na instrumentu NextSeq 550Dx automatski započinje sekundarnu analizu. Procesi sekundarne analize opisani ovdje odnose se na module Germline i Somatic Variant.

## Demultipleksiranje

Demultipleksiranje uspoređuje svaku sekvencu čitanja indeksa s navedenim sekvencama indeksa za obradu. U tom se koraku ne gledaju vrijednosti kvalitete.

Čitanja indeksa prepoznaju se u sljedećim koracima:

- ▶ Uzorci se numeriraju počevši od 1 na temelju redoslijeda kojim su navedeni za obradu.
- ▶ Broj uzorka 0 rezerviran je za klastere koji nisu dodijeljeni uzorku.
- ▶ Klasteri se dodjeljuju uzorku kad se sekvenca indeksa točno podudara ili kad se nađe maksimalno jedno nepodudaranje po čitanju indeksa.

## Generiranje FASTQ datoteke

Nakon demultipleksiranja softver generira sporedne datoteke analize u formatu FASTQ, a to je tekstni format korišten za predstavljanje sekvenci. FASTQ datoteke sadrže očitavanja za svaki uzorak i povezano bodovanje kvalitete. Klasteri koji nisu zadovoljili filter izostavljaju se.

Svaka FASTQ datoteka sadrži očitavanja samo za jedan uzorak, a naziv tog uzorka uvršten je u naziv FASTQ datoteke. U modulima Germline i Somatic Variant generira se osam datoteka FASTQ po uzorku i po skupu oligonukleotida – četiri iz očitavanja 1 i četiri iz očitavanja 2. Krajnji rezultat je ukupno 8 FASTQ datoteka za spolne stanice i 16 datoteka FASTQ za somatske stanice. FASTQ datoteke primarne su ulazne datoteke za usklađivanje.

## Usklađivanje

Tijekom koraka usklađivanja stupnjeviti Smith-Watermanov algoritam usklađuje klastere iz svakog uzorka sa sekvencama amplikona navedenim u datoteci manifesta.

Stupnjeviti Smith-Watermanov algoritam izvodi poluglobalno usklađivanje sekvenci radi određivanja sličnih područja između dviju sekvenci. Umjesto uspoređivanja ukupne sekvence, Smith-Watermanov algoritam uspoređuje segmente svih mogućih dužina.

Svako čitanje s uparenim krajevima procjenjuje se s obzirom na usklađenost s relevantnim probnim sekvencama za to čitanje.

- ▶ Prvo čitanje procjenjuje se u odnosu na reverzni komplement silaznih oligonukleotida specifičnih za lokus (Downstream Locus-Specific Oligos, DLSO).
- ▶ Drugo čitanje procjenjuje se u odnosu na ulazne oligonukleotide specifične za lokus (Upstream Locus-Specific Oligos, ULSO).
- ▶ Ako se početak čitanja podudara s probnom sekvencom uz ne više od tri razlike (nepodudaranja ili pomaci zbog vodećih indela), puna dužina čitanja usklađuje se s amplikonskim ciljem za tu sekvencu.
- ▶ Indeli u DLSO-u i ULSO-u ne promatraju se zbog kemije analize.

Usklađivanja se filtriraju iz rezultata usklađivanja na temelju omjera nepodudaranja u području interesa ili potpunog amplikona, ovisno o dužini amplikona. Filtrirana usklađivanja zapisuju se u datoteke usklađivanja kao neusklađena i ne upotrebljavaju se u prepoznavanju varijante.

## Otkrivanje varijante

Alat za otkrivanje varijanti Pisces namijenjen je otkrivanju varijanti s jednim nukleotidom i indelima u bibliotekama pripremljenim za instrument.

## Izvešća i dodatne izlazne datoteke

Moduli za analizu varijanti generiraju izvješća u obliku PDF-a i dokumenata s podacima odijeljenim tabulatorima (\*.txt) u kojima se prikazuju mjerni podaci poput dubine sekvenciranja i broja varijanti. Moduli generiraju i izlazne datoteke u oblicima poput VCF i formata za otkrivanje varijanti (Variant Call Format, gVCF) za aplikacije namijenjene otkrivanju varijanti.

## Postupci kontrole kvalitete

Softver instrumenta NextSeq 550Dx uspoređuje svaku obradu, uzorak i otkrivanje baza s mjernim podacima za kontrolu kvalitete. Upotreba pozitivnih i negativnih kontrola preporučuje se i u pripremi biblioteka pri čemu ih je potrebno ocijeniti. Ocijenite kontrole na sljedeći način:

- **Negativna kontrola (kontrola bez predloška) ili neka druga negativna kontrola** – mora dati očekivani rezultat. Ako negativna kontrola da rezultat različit od očekivanog, moguće je da se dogodila pogreška u praćenju uzorka, nepravilno bilježenje primera za indeksiranje ili kontaminacija.
- **Uzorak za pozitivnu kontrolu** – mora dati očekivani rezultat. Ako pozitivna kontrola da rezultat različit od očekivanog, moguće je da se dogodila pogreška u praćenju uzorka ili nepravilno bilježenje primera za indeksiranje.

## Karakteristike radnih svojstava

Karakteristike radnih svojstava za instrument NextSeq 550Dx utvrđene su pomoću modula Germline i Somatic Variant s kompletima TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) te potvrđeni pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Ispitivanja su obuhvaćala indeksiranje uzoraka, kontaminacija uzoraka, DNA ulazne podatke, analitičku osjetljivost (granica praznog uzorka / granica prepoznavanja), točnost, preciznost, usporedbu metoda i ponovljivost.

Analitička ispitivanja pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) namijenjena su procjeni tvrdnji o radnim svojstvima već utvrđenim kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa). Rezultati pokazuju da kompleti reagensa (v2 i v2.5) imaju slična radna svojstva kad se upotrebljava komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Pročitajte *Informativni pregled za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* da biste pronašli karakteristike radnih svojstava povezane s predanalitičkim faktorima, poput metoda izdvajanja ili ometajućih tvari.

## Definicije izračuna upotrijebljenih u karakteristikama radnih svojstava

- 1 Slaganje u pozitivnom postotku (Positive Percent Agreement, PPA) izračunava se kao udio lokusa koje je referentna metoda klasificirala kao varijante, a koje analiza točno prijavljuje.
  - ▶ (br. lokusa varijanti koje je analiza točno prepoznala) / (ukupan br. lokusa varijanti)  
Lokusi varijanti koje prijavljuje analiza i koji su u skladu s referentnom metodom pravi su pozitivni rezultati (TP-ovi). Lokusi varijanti koje analiza prijavljuje kao otkrivanja referenci ili kao otkrivanja drugačijih varijanti lažno su negativni rezultati (FN-ovi).
- 2 Slaganje u negativnom postotku (Negative Percent Agreement, NPA) izračunava se kao udio lokusa koje referentna metoda klasificira kao divlji tip, a koje analiza točno prijavljuje.
  - ▶ (br. lokusa divljeg tipa koje je analiza točno prepoznala) / (ukupan br. lokusa divljeg tipa)

Lokusi divljeg tipa koje prijavljuje analiza i koji su u skladu s referentnom metodom pravi su negativni rezultati (TN-ovi). Lokusi divljeg tipa koje analiza prepoznaje kao varijante lažni su pozitivni rezultati (FP-ovi).

- 3 Slaganje u ukupnom postotku (overall percent agreement, OPA) izračunava se kao udio lokusa koje analiza pravilno prijavljuje u odnosu na referentnu metodu.
  - ▶  $((\text{br. lokusa varijanti koje analiza točno prepoznaje}) + (\text{br. lokusa divljeg tipa koje analiza točno prepoznaje})) / ((\text{ukupan br. lokusa varijanti}) + (\text{ukupan br. lokusa divljeg tipa}))$
- 4 Izračuni PPA, NPA i OPA ne obuhvaćaju ništetne obrade (lokuse varijanti ili referentne lokuse koji ne zadovoljavaju jedan filter kvalitete ili više njih).
- 5 Rezultat autosomnog prepoznavanja izračunava se kao ukupan broj lokusa koji prolaze filtre podijeljen ukupnim brojem sekvenciranih položaja za kromosome 1 – 22; kromosomi X i Y su isključeni. Ti mjerni podaci ne uzimaju u obzir slaganje otkrivanja s referentnom metodom.

## Radna svojstva kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa)

### Indeksiranje uzoraka

Primeri za indeksiranje uzoraka dodani tijekom pripreme biblioteke dodjeljuju jedinstven niz svakom uzorku DNA. Ti jedinstveni nizovi omogućuju formiranje skupova više uzoraka kroz jednu obradu sekvenciranjem. Indeksiranje uzoraka upotrebljava se u tijekovima rada za spolne i somatske stanice. Svrha ovog ispitivanja bila je utvrđivanje minimalnog (8) i maksimalnog (96) broja uzoraka koji se mogu obuhvatiti jednom obradom sekvenciranjem na instrumentu NextSeq 550Dx. Testirano je osam jedinstvenih uzoraka „platinastog genoma“ s 12 različitih kombinacija primera za indeksiranje po uzorku. Rezultati uzoraka nakon četiri obrade sekvenciranjem pomoću modula Germline Variant uspoređeni su s verzijom „platinastog genoma“ 2016-1.0.

U prvom nizu obrada pomoću reprezentativne obrade testirano je 96 jedinstveno indeksiranih biblioteka uzoraka radi ispitivanja raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza po lancu u sva 23 humana kromosoma kako bi se potvrdila sposobnost analize da dosljedno otkrije genotip za dani uzorak u različitim kombinacijama primera za indeksiranje. U drugom nizu obrada sekvencirano je osam jedinstveno indeksiranih biblioteka uzoraka u dvije obrade sekvenciranjem radi potvrde minimalnog broja podržanih indeksa.

U obradama s 96 indeksa PPA za SNV-ove bio je u rasponu od 98,7 % do 100 %, PPA za umetanja i delecije bio je 100 %, a NPA je bio 100 % za svaku od 96 kombinacija indeksa. Obrade s 8 indeksa imale su vrijednosti PPA od 100 % (SNV-ovi, umetanja i delecije) i NPA od 100 % za svaku od osam kombinacija indeksa.

### Kontaminacija uzoraka

Instrument NextSeq 550Dx dopušta sekvenciranje više uzoraka i kontrole u jednoj obradi sekvenciranjem. Provedeno je ispitivanje radi određivanja razmjera kontaminacije uzoraka u obradi sekvenciranjem (unutar obrade) i između obrada sekvenciranjem (od obrade do obrade). Reprezentativnom analizom testirana su dva uzorka „platinastog genoma“, jedan muški i jedan ženski, s namjerom da se pronađu razni geni uz obuhvaćanje 12 588 baza (150 amplikona) u 23 različita kromosoma, uključujući oba spolna kromosoma. Na instrumentu NextSeq 550Dx sekvencirane su biblioteke primjenom modula Germline Variant. Opažena je kontaminacija ženskih uzoraka muškim uzorcima i to prema prisutnosti očitavanja amplikona kromosoma Y u ženskim uzorcima.

Kontaminacija unutar obrade može se dogoditi tijekom generiranja klastera, otkrivanja baza u ciklusu indeksiranja i demultipleksiranja uzorka. Za testiranje kontaminacije uzorka unutar obrade sekvenciranjem jedanput je na instrumentu NextSeq 550Dx sekvenciran skup biblioteka koji se sastojao od po 46 replika muških i ženskih uzoraka te četiri kontrole bez predloška. Kontaminacija uzoraka analizirana je usporedbom pokrivenosti amplikona kromosoma Y u svakoj ženskoj replici s prosječnom pokrivenosti amplikona kromosoma Y u svim muškim replika u skupu. Opažena srednja vrijednost kontaminacije unutar obrade iznosila je 0,084 %.

Za testiranje kontaminacije uzoraka između obrada pripremljena su i uzastopno sekvencirana na instrumentu NextSeq 550Dx dva skupa biblioteka. Prvi je skup sadržavao 46 replika ženskog uzorka i dvije kontrole bez predloška. Drugi je skup sadržavao 46 replika muškog uzorka i dvije kontrole bez predloška. Oba skupa upotrebljavala su isti skup prilagodnika indeksa. Ženski skup bio je sekvenciran prvi. Zatim je uslijedila obrada sekvenciranjem muškog skupa, a nakon nje ponovljena je obrada sekvenciranjem ženskog skupa. Kontaminacija uzoraka između obrada analizirana je usporedbom pokrivenosti amplikona kromosoma Y između odgovarajućih replika iz ponovljene obrade ženskog skupa i obrade muškog skupa. Opažena srednja vrijednost kontaminacije između obrada iznosila je 0,0076 %.

## Ulazna DNA

Krv (spolne stanice)

Za instrument NextSeq 550Dx određen je raspon ulazne DNA iz krvi za pripremu biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i uz korištenje tijekom rada modula Germline Variant. Taj je raspon određen kroz ispitivanje serijskim razrjeđivanjem u kojem je korišteno 13 uzoraka „platinastog genoma“ i reprezentativna analiza namijenjena ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza u 23 različita kromosoma. Biblioteka je sekvencirana dvama instrumentima NextSeq 550Dx uz primjenu jedne serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa).

Testirano je pet duplikata uzoraka na pet razina ulazne DNA u rasponu od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng i 12 ng). Testirano je osam uzoraka u jednoj replici na svakoj od pet razina ulazne DNA. Za određivanje točnosti uspoređeni su genotipi uzoraka s „platinastim genomom“ verzije 2016-1.0. Rezultati su određeni za svaku ulaznu razinu. PPA za svaku vrstu varijante (SNV-ovi, umetanja i delecije) predstavljen je u Tbl. 1; NPA je predstavljen u Tbl. 2. Sve ulazne razine imale su sličnu točnost. Preporučena ulazna DNA za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx jest 50 ng s 25 ng i 100 ng, pod uvjetom da donja i gornja granica zadovoljavaju karakteristike radnih svojstava.

Tbl. 1 Rezultati PPA za svaku ulaznu DNA prema vrsti varijante

Ulazna DNA (ng)	Vrsta varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	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	Umetanje	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	Delecija	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

Tbl. 2 NPA za svaku ulaznu DNA

Ulazna DNA (ng)	TN	FP	Referentno neotkrivanje	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 (somatske stanice)

Za instrument NextSeq 550Dx određen je raspon ulazne DNA fiksirane u formalinu i umetnute u parafin (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) za pripremu biblioteka pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx korištenjem tijeka rada modula Somatic Variant. Raspon ulazne DNA određen je ispitivanjem serijskim razrjeđivanjem u kojem su korištena tri uzorka „platinastog genoma“ i reprezentativna analiza namijenjena ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza u 23 različita kromosoma. Nakon izdvajanja DNA linije stanica „platinastog genoma“ GM12878 i GM12877 fiksirane su u formalinu i umetnute u parafin. GM12878 je razrijeđen linijom GM12877 na takav način da su učestalosti alelnih varijanti (VAF-ovi) kod 81 varijante (55 SNV-ova, 10 umetanja i 16 delecija) bile blizu 0,025, 0,05 ili 0,10. Uz to, svaki je uzorak imao 91 varijantu s većim učestalostima varijanti do 1,0 VAF-a. Uzorci su obrađeni u duplikatima na pet razina ulazne DNA sa srednjim delta kvantitativnim ciklusom (dCq) od 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 i 7,8 mjereno kompletom TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Svaka je biblioteka sekvencirana dvama instrumentima NextSeq 550Dx uz primjenu dviju serija kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa). Pri određivanju točnosti uspoređivana su određivanja varijanti u uzorcima s verzijom „platinastog genoma“ 2016-1.0. PPA za svaku vrstu varijante (SNV-ovi, umetanja i delecije) predstavljena u Tbl. 3; NPA je predstavljen u Tbl. 4. Preporučena ulazna DNA za varijante pri 0,05 VAF-a ili više jest dCq ≤ 4 pri čemu 4,6 daje nižu granicu radi zadovoljavanja karakteristika radnih svojstava.

Tbl. 3 Rezultati PPA za svaku ulaznu DNA prema vrsti varijante

Srednja vrijednost dCq	Vrsta varijante	Očekivane varijante	Očekivana neotkrivanja	Ciljni VAF razrjeđivanja					
				0,025		0,05		0,10	
				Varijanta bez otkrivanja	PPA (%)	Varijanta bez otkrivanja	PPA (%)	Varijanta bez otkrivanja	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nije primjenjivo.	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	Umetanje	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	Delecija	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

Tbl. 4 NPA za svaku ulaznu DNA

Srednja vrijednost dCq	Očekivan divlji tip	Ciljni VAF razrjeđivanja					
		0,025		0,05		0,10	
		Referentno neotkrivanje	NPA (%)	Referentno neotkrivanje	NPA (%)	Referentno neotkrivanje	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

### Analitička osjetljivost (granica praznog uzorka [Limit of Blank, LoB] i granica prepoznavanja [Limit of Detection, LoD])

To je ispitivanje provedeno radi određivanja granice praznog uzorka (LoB) i granice prepoznavanja (LoD) za modul Somatic Variant na instrumentu NextSeq 550Dx. Izvedeno je upotrebom reprezentativne analize namijenjene ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza u 23 različita kromosoma. Nakon izdvajanja DNA linije stanica „platinastog genoma“ GM12878 i GM12877 fiksirane su u formalinu i umetnute u parafin. GM12878 je razrijeđen linijom GM12877 na način da su učestalosti varijanti kod 74 varijante (53 SNV-ova, 7 umetanja i 14 delecija) bile  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 i razrijeđena linija GM12878 (GM12878-D) testirani su tijekom šest uzastopnih dana na jednom instrumentu, izmjenjujući dvije serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) u ukupno šest obrada sekvenciranjem. To je testiranje dalo 60 replika za svaku varijantu u GM12878-D i 72 replike za svaku odgovarajuću koordinatu divljeg tipa u liniji GM12877 za svaku seriju reagensa. LoB i LoD izračunati su uz korištenje klasičnog pristupa navedenog u dokumentu CLSI EP17-A2 te uz upotrebu opcije bez parametara. LoB i LoD izračunati su za SNV-ove, umetanja i delecije zasebno, stvaranjem skupova učestalosti varijanti za dane vrste varijanti. Pogreška vrste I definirana je kao 0,01, a pogreška vrste II kao 0,05.

U slučaju LoB-a, učestalosti varijanti objedinjenih u skupove sortirane su od najmanje do najveće te je izračunat položaj na 99. mjestu za svaku seriju reagensa za svaku vrstu varijante (Tbl. 5). Modul Somatic Variant za određivanje kvalitativnog prepoznavanja varijanti upotrebljava graničnu vrijednost (efektivni LoB) 0,026 VAF-a. Izračunati LoB potvrdio je da ta granična vrijednost daje pogrešku vrste I od maksimalno 0,01.

Tbl. 5 Granica praznog uzorka

Vrsta varijante	Ukupan broj promatranja	Serijski reagens za LoB 1 (%)	Serijski reagens za LoB 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Umetanje	504	0,56	0,56
Delecija	1008	1,20	1,20

U slučaju LoD-a, izračunat je postotak učestalosti pojedinačnih mutacija za svaku seriju reagensa za svaku vrstu varijante koja je manja od granične vrijednosti 0,026 Tbl. 6. Postoci su bili manji od pogreške vrste II koja iznosi 5 % (0,05), pa je medijan kombiniranih učestalosti varijanti izračunat kao LoD (Tbl. 6). Kao LoD za svaku vrstu varijante uzeta je veća od dviju vrijednosti izračunatih za dvije serije reagensa – 4,97 % za SNV-ove, 5,12 % za umetanja i 5,26 % za delecije.

Tbl. 6 Granica prepoznavanja

Serijska reagensna	Vrsta varijante	Ukupan broj promatranja	Br. mjerenja VAF-a < 2,6 %	% mjerenja VAF-a < 2,6 %	Granica prepoznavanja (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Umetanje	420	6	1,4	5,08
	Delecija	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Umetanje	420	5	1,2	5,12
	Delecija	840	7	0,80	5,26

## Točnost

### Spolne stanice

Sljedeće ispitivanje provedeno je radi procjene točnosti otkrivanja varijanti modula Germline Variant na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa). Testirano je 13 jedinstvenih uzoraka „platinastog genoma“ pomoću reprezentativne analize namijenjene ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza (150 amplikona) u 23 različita kromosoma. Izvedeno je ukupno devet obrada na tri instrumenta za sekvenciranje, s tri serije reagensa i tri rukovatelja tijekom pet početnih dana. Točnost je određena za SNV-ove (varijante s jednim nukleotidom), umetanja i delecije usporedbom rezultata referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita pomoću verzije „platinastog genoma“ 2016-1.0. Definirana su pouzdana područja genoma na temelju te referentne metode, osim u slučajevima kad je navedeno drugačije.

Tbl. 7 Sažetak slaganja za spolne stanice

Kriteriji	Ukupan broj promatranja <sup>1</sup>	Rezultat dobiven promatranjem <sup>2</sup>	Rezultat dobiven obradom <sup>3</sup>
PPA za SNV	819	98,7	> 99,9
PPA za umetanja	819	95,0	98,9
PPA za delecije	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Izračunato kao broj uzoraka po obradi (91) x broj obrada (9) = 819.

<sup>2</sup>Najmanja promatrana vrijednost po replici uzorka u svih 9 obrada.

<sup>3</sup>Najmanja vrijednost kad se podaci iz svake obrade agregatno analiziraju.

Tbl. 8 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene uz pozitivno i negativno slaganje u postotku gledano prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s „platinastim genomom“ verzije 2016-1.0 za PPA izračune. Kombiniraju se tri vrste varijanti (SNV-ovi, umetanja i delecije). Referentna metoda nudi samo rezultate za jednonukleotidne varijante i umetanja/delecije, rezultati s bazama koji nisu u varijanti uspoređuju se s međuverzijom niza referentnog humanog genoma hg19 radi NPA izračuna.

Tbl. 8 Slaganje prema uzorku za spolne stanice

Uzorak	Srednja uspješnost otkrivanja	Očekivane varijante <sup>1</sup>	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	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

Uzorak	Srednja uspješnost otkrivanja	Očekivane varijante <sup>1</sup>	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	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> Ukupan broj varijanti u svim replikama uzorka u 9 obrada.

Tbl. 9 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita. Prepoznavanje se procjenjuje za svaku vrstu varijante – SNV-ove, umetanja i delecije – zasebno. Referentni se položaji ne računaju.

Tbl. 9 Slaganje za uzorak prema vrsti varijante za spolne stanice

Uzorak	SNV-ovi			Umetanja			Delecije		
	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN	Očekivano	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

Uzorcima su dodatno analizirani za otkrivanje malih umetanja i delecija (indela). Ukupan sažetak predstavljen je u Tbl. 10. Pronađen je ukupno 71 indel različite veličine: 1 – 24 bp za umetanja i 1 – 25 bp za delecije.

Tbl. 10 Sažetak prepoznavanja indela za spolne stanice

Vrsta varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	PPA
Umetanje	18522	18018	27	477	99,9
Delecija	17388	17073	0	315	100



Reprezentativna analiza sastojala se od 150 amplikona čija je namjena pokrivanje raznih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona u rasponu od 0,19 do 0,87. Amplikoni su imali i raspon od jednonukleotidnih (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. Podaci su kompilirani prema amplikonima (Tbl. 11) radi utvrđivanja utjecaja genomskog sadržaja na postotak točnih otkrivanja. Postotak točnih otkrivanja sastoji se od otkrivanja varijanti i referentnih otkrivanja te iznosi manje od 100 % ako ima netočnih otkrivanja ili nema otkrivanja.

Tbl. 11 Točnost za spolne stanice na razini amplikona

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nije primjenjivo	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primjenjivo	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nije primjenjivo	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202176	22202148	73	73	Nije primjenjivo	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nije primjenjivo	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nije primjenjivo	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nije primjenjivo	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primjenjivo	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primjenjivo	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primjenjivo	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primjenjivo	0,65	81900	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primjenjivo	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nije primjenjivo	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primjenjivo	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (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), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primjenjivo	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nije primjenjivo	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nije primjenjivo	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primjenjivo	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primjenjivo	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nije primjenjivo	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primjenjivo	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nije primjenjivo	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nije primjenjivo	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	Nije primjenjivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	Nije primjenjivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nije primjenjivo

Rezultati sekvenciranja za uzorak NA12878 uspoređeni su s visokopouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za norme i tehnologije (National Institute of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona njih 92 bilo je posve sadržano u visoko pouzdanim genomskim područjima, za 41 amplikon bilo je djelomičnih preklapanja, a za 17 amplikona nije bilo preklapanja s NIST-ovim nizom. Taj ishod dao je 10 000 koordinata po replici za usporedbu. Otkrivanja baza izvan varijanti uspoređena su s međuverzijom hg19 referentnog niza humanog genoma. Rezultati točnosti prikazani su u Tbl. 12.

Tbl. 12 Slaganje spolnih kromosoma za uzorak NA12878 s NIST-ovom bazom podataka

Uzorak	Br. amplikona	Srednja uspješnost otkrivanja	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Na temelju podataka dobivenih ovim ispitivanjem spolnih kromosoma u devet obrada, instrument NextSeq 550Dx može dosljedno sekvencirati sljedeće:

- ▶ sadržaj GC  $\geq$  19 % (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona s 19 % točno otkrivenog sadržaja GC uz rezultat neotkrivanja od 0,6 %)
- ▶ sadržaj GC  $\leq$  87 % (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona s 87 % točno otkrivenog sadržaja GC uz nula neotkrivanja)
- ▶ dužine PolyA  $\leq$  9 (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyA devet nukleotida uz nula neotkrivanja)
- ▶ dužine PolyT  $\leq$  10 (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyT deset nukleotida uz nula neotkrivanja)
- ▶ dužine PolyG  $\leq$  7 (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyG sedam nukleotida uz rezultat neotkrivanja od 1,0 %)
- ▶ dužine PolyC  $\leq$  6 (sve su otkrivene baze u 2457 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyC šest nukleotida uz nula neotkrivanja)
- ▶ dužine dinukleotidnih ponavljanja  $\leq$  11x (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno dinukleotidno ponavljanje 11x uz rezultat neotkrivanja od 0,5 %)
- ▶ dužine trinukleotidnih ponavljanja  $\leq$  5x (sve su otkrivene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno trinukleotidno ponavljanje 5x uz rezultat neotkrivanja od 0,5 %)
- ▶ dužine umetanja  $\leq$  24 (66343 od 66370 otkrivenih baza u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkrivenu 24-nukleotidno umetanje uz rezultat neotkrivanja od 1,2 %; nije se dogodilo nijedno netočno otkrivanje u području koje sadrži umetanje od 24 nukleotida)
- ▶ dužine delecije  $\leq$  25 (sve su otkrivene baze u 2457 sekvencirana amplikona koji sadrže točno otkrivenu 25-nukleotidnu deleciju uz nula neotkrivanja)

#### Somatske stanice

Ovdje opisano ispitivanje upotrijebljeno je za procjenu točnosti otkrivanja varijanti modula Somatic Variant na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa).

U tom je ispitivanju primijenjena reprezentativna analiza namijenjena ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza (150 amplikona) u 23 različita kromosoma. DNA koja pripada tzv. „platinastom genomu“ (Platinum Genome) izdvojena je iz blokova tretiranih FFPE-om radi generiranja šest jedinstvenih uzoraka za proučavanje tijekom ispitivanja.

Uzorak DNA GM12877 razrijeđen je uzorkom DNA GM12878 radi stvaranja uzoraka GM12877-D5 i GM12877-D7 kao skupova jedinstvenih heterozigotnih varijanti s frekvencijom varijanti bliskom 5 % i 7 %. Uzorak DNA GM12878 na sličan je način razrijeđen uzorkom DNA GM12877 radi stvaranja uzoraka GM12878-D5 i GM12878-D7. Svaki od tih uzoraka testiran je u tri primjerka, osim razrijeđenih uzoraka koji su testirani u šest replika. Izvedeno je ukupno devet obrada na tri instrumenta za sekvenciranje, s tri serije reagensa i tri rukovatelja tijekom pet početnih dana. Točnost je određena za SNV-e (varijante s jednim nukleotidom), umetanje i delecije usporedbom rezultata



referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita pomoću verzije „platinastog genoma“ 2016-1.0. Definirana su pouzdana područja genoma na temelju te referentne metode, osim u slučajevima kad je navedeno drugačije.

Tbl. 13 Sažetak somatskog slaganja

Kriteriji	Ukupan broj promatranja <sup>1</sup>	Rezultat dobiven promatranjem <sup>2</sup>	Rezultat dobiven obradom <sup>3</sup>
PPA za SNV	378	98,9	99,9
PPA za umetanja	378	96,9	99,9
PPA za delecije	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Izračunato kao broj uzoraka po obradi (42) x broj obrada (9) = 378.

<sup>2</sup>Najmanja promatrana vrijednost po replici uzorka u svih 9 obrada.

<sup>3</sup>Najmanja vrijednost kad se podaci iz svake obrade agregatno analiziraju.

Tbl. 14 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene uz pozitivno i negativno slaganje u postotku gledano prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita za PPA izračune. Kombiniraju se tri vrste varijanti (SNV-ovi, umetanja i delecije). Referentna metoda nudi samo rezultate za jednonukleotidne varijante i umetanja/delecije, rezultati s bazama koji nisu u varijanti uspoređuju se s međuverzijom niza referentnog humanog genoma hg19 radi NPA izračuna.

Tbl. 14 Somatsko slaganje prema uzorku

Uzorak	Srednja uspješnost otkrivanja	Očekivano	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	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

Tbl. 15 sadrži podatke dobivene ispitivanjem predstavljene prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante uspoređuju s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita. Prepoznavanje se procjenjuje za svaku vrstu varijante – SNV-ove, umetanja i delecije – zasebno. Referentni se položaji ne računaju.

Tbl. 15 Somatsko slaganje za uzorak prema vrsti varijante

Uzorak	SNV-ovi			Umetanja			Delecije		
	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN	Očekivano	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

Uzorak	SNV-ovi			Umetanja			Delecije		
	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Deset uzoraka dodatno je analizirano radi otkrivanja malih umetanja i delecija (indela) (Tbl. 16). Pronađen je ukupno 71 indel različite veličine: 1 – 24 bp za umetanja i 1 – 25 bp za delecije.

Tbl. 16 Sažetak somatskih prepoznavanja indela

Vrsta varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez otkrivanja	PPA
Umetanje	10773	10282	9	482	99,2
Delecija	11502	10667	5	830	> 99,9

Izrađeno je 150 amplikona radi pokrivanja različitih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona bio je u rasponu od 0,19 do 0,87 %. Amplikoni su bili u rasponu jednonukleotidnih (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. Podaci su kompilirani prema amplikonima (Tbl. 17) radi utvrđivanja utjecaja genomskog sadržaja na postotak točnih otkrivanja. Postotak točnih otkrivanja sastoji se od otkrivanja varijanti i referentnih otkrivanja te iznosi manje od 100 % ako ima netočnih otkrivanja ili nema otkrivanja.

Tbl. 17 Točnost za somatske stanice na razini amplikona

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Nije primjenjivo	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Nije primjenjivo	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primjenjivo	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Nije primjenjivo	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202176	22202148	73	73	Nije primjenjivo	0,44	27575	0	28	99,9

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Nije primjenjivo	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Nije primjenjivo	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Nije primjenjivo	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primjenjivo	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primjenjivo	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primjenjivo	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primjenjivo	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Nije primjenjivo	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	Nije primjenjivo	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primjenjivo	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Nije primjenjivo	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primjenjivo	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (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), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primjenjivo	0,37	34386	0	12	> 99,9

Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Nije primjenjivo	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Nije primjenjivo	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primjenjivo	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primjenjivo	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Nije primjenjivo	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primjenjivo	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Nije primjenjivo	0,6	37398	0	24	99,9



Amplikon	Kromosom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim područjima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Točna otkrivanja	Netočna otkrivanja	Bez otkrivanja	% točnih otkrivanja
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Nije primjenjivo	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primjenjivo	0,55	0	0	0	Nije primjenjivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primjenjivo	0,48	0	0	0	Nije primjenjivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nije primjenjivo

Rezultati sekvenciranja za uzorak GM12878 uspoređeni su s visokopouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za norme i tehnologije (National Institute of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona njih 92 bilo je posve sadržano u visoko pouzdanim genomskim područjima, za 41 amplikon bilo je djelomičnih preklapanja, a za 17 amplikona nije bilo preklapanja s NIST-ovim nizom. Taj ishod dao je 10 000 koordinata po replici za usporedbu. Otkrivanja baza izvan varijanti uspoređena su s međuverzijom hg19 referentnog niza humanog genoma. Rezultati točnosti prikazani su u Tbl. 18.

Tbl. 18 Slaganje somatskih kromosoma za uzorak GM12878 s NIST-ovom bazom podataka

Uzorak	Br. amplikona	Srednja uspješnost otkrivanja	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Na temelju podataka dobivenih ovim ispitivanjem somatskih kromosoma u devet obrada, instrument NextSeq 550Dx može dosljedno sekvencirati sljedeće:

- ▶ sadržaj GC  $\geq$  19 % (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona s 19 % točno otkrivenog sadržaja GC uz rezultat neotkrivanja od 2,6 %)
- ▶ sadržaj GC  $\leq$  87 % (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona s 87 % točno otkrivenog sadržaja GC uz rezultat neotkrivanja od 0,6 %)
- ▶ dužine PolyA  $\leq$  9 (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyA devet nukleotida uz rezultat neotkrivanja od 2,5 %)
- ▶ dužine PolyT  $\leq$  10 (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyT deset nukleotida uz rezultat neotkrivanja od 0,1 %)
- ▶ dužine PolyG  $\leq$  6 (sve su otkrivene baze u 2268 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyG šest nukleotida uz rezultat neotkrivanja od 0,5 %)
- ▶ dužine PolyC  $\leq$  6 (sve su otkrivene baze u 756 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno ponavljanje PolyC šest nukleotida uz rezultat neotkrivanja od 0,4 %)
- ▶ dužine dinukleotidnih ponavljanja  $\leq$  4x (sve su otkrivene baze u 1890 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno dinukleotidno ponavljanje 4x uz rezultat neotkrivanja od 0,9 %)
- ▶ dužine trinukleotidnih ponavljanja  $\leq$  5x (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkriveno trinukleotidno ponavljanje 5x uz rezultat neotkrivanja od 1,4 %)
- ▶ dužine umetanja  $\leq$  23 (sve su otkrivene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže točno otkrivenu 23-nukleotidno umetanje uz rezultat neotkrivanja od 0,8 %)
- ▶ dužine delecije  $\leq$  25 (sve su otkrivene baze u 1134 sekvencirana amplikona koji sadrže točno otkrivenu 25-nukleotidnu deleciju uz rezultat neotkrivanja od 0,7 %)

## Preciznost

Preciznost instrumenta NextSeq 550Dx određena je testiranjem 13 jedinstvenih uzoraka „platinastog genoma“ primjenom tri instrumenta, tri serije reagensa i tri rukovatelja pri čemu je generirano devet obrada sekvenciranjem tijekom pet dana. Reprezentativna analiza, uzorci i referentna metoda isti su kao što je opisano za ispitivanje točnosti spolnih stanica. Udjeli preciznosti utvrđeni su analizom komponente varijance pomoću VAF-a kao varijablu odziva i izračunom standardnih devijacija na razini komponente za instrument, seriju reagensa, rukovatelja i dan početka (Tbl. 19). Ukupan broj promatranja korištenih u analizi svake komponente varijabilnosti instrumenta, rukovatelja ili serije reagensa bio je 699, 176 i 235 za SNV-ove, umetanja i delecije – tim redoslijedom.

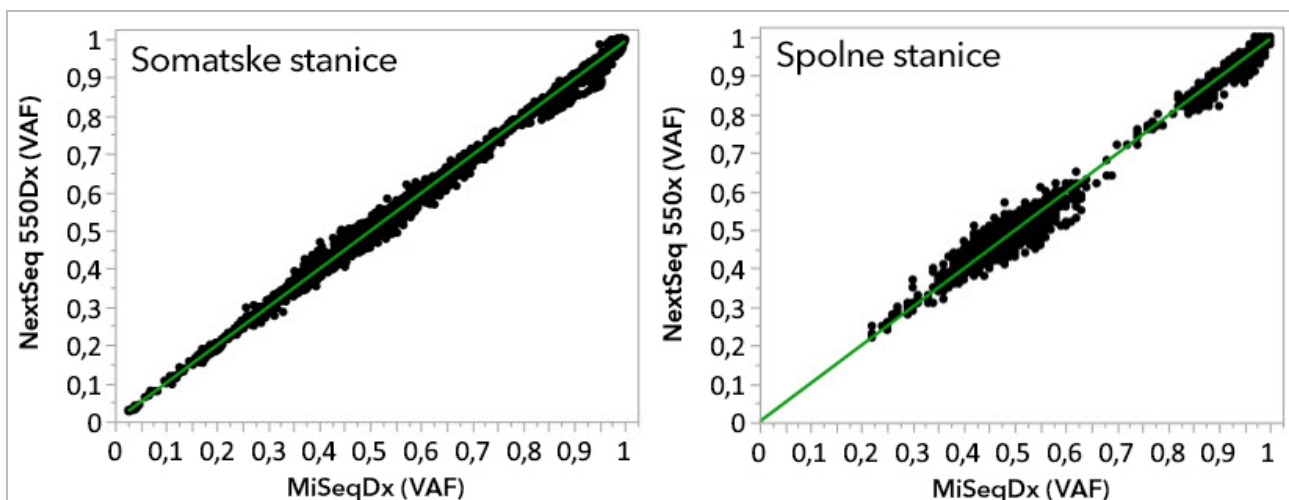
Tbl. 19 Rezultati preciznosti za instrument NextSeq 550Dx (standardna devijacija)

Komponenta	Vrsta varijante	SD komponente		Ukupna SD	
		Maks	Medijan	Maks	Medijan
Serija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Umetanje	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delecija	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Umetanje	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delecija	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Rukovatelj	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Umetanje	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delecija	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dan	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Umetanje	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delecija	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Usporedba metoda (platforma za sekvenciranje)

Uzorci pune krvi i FFPE uzorci analizirani su na instrumentima NextSeq 550Dx i MiSeqDx pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx za tijek rada sa spolnim i somatskim stanicama. Slaganje učestalosti varijanti za uzorke krvi i FFPE uzorke analizirani su primjenom više reprezentativnih analiza. Sl. 2 prikazuje korelaciju VAF-a između dvaju instrumenata za jednu reprezentativnu analizu, dok Tbl. 20 donosi sažetak te korelacije prema panelu analize. Na temelju jake korelacije između instrumenata MiSeqDx i NextSeq 550Dx, utvrđeno je da su karakteristike radnih svojstava povezane s predanalitičkim faktorima (npr. metode izdvajanja ili ometajuće tvari) primjenjive na oba instrumenta. Dodatne pojedinosti potražite u Informativnom pregledu za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Sl. 2 Korelacija VAF-a instrumenata MiSeqDx i NextSeq 550Dx za FFPE uzorke (lijevo) i uzorke krvi (desno) uz upotrebu analize 1



Tbl. 20 Rezultati usporedbe metoda uz korištenje jedinstvenih uzoraka krvi i FFPE uzoraka

Izvor gDNA	Analiza (panel oligonukleotida)	Biološke replike (uzorci)	Tehničke replike (za uzorak)	Promatranja (br. varijanti)	Nagib	Odsječak	Korelacija (R <sup>2</sup> )
Krv	Analiza 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Krv	Analiza 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analiza 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Analiza 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Uklonjene su dvije točke podataka na temelju navedenog ograničenja za modul Germline Variant.

<sup>2</sup>Koeficijent određivanja za prikaze VAF-a kao što prikazuje Slika 2.

## Ponovljivost

Ponovljivost na instrumentu NextSeq 550Dx dokazana je pomoću uzoraka „platinastog genoma“ s reprezentativnom analizom namijenjenom ispitivanju raznih gena uz obuhvaćanje 12 588 baza u 23 različita kromosoma pomoću 150 amplicona. Testiranje spolnih stanica sastojalo se od sedam replika 13 uzoraka; testiranje somatskih stanica sastojalo se od šest replika sedam uzoraka s različitim razinama VAF-a. Uzorci su pripremljeni upotrebom kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testiranje je izvedeno na tri vanjske lokacije upotrebom jedne serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa). Na svim je lokacijama upotrijebljen jedan instrument NextSeq 550Dx. Na svim su lokacijama testiranje izvodila dva rukovatelja. Svaki je rukovatelj testirao svaku vrstu uzorka kroz tri dana (ne uzastopnih) u ukupno 36 obrada na sve tri lokacije. To je testiranje dalo 18 obrada za svaki od tijekova rada za spolne i somatske stanice.

### Spolne stanice

Varijante u spolnim kromosomima s razinom VAF-a  $\geq 0,2$  prijavljene su kao pozitivne (varijante). Za očekivano pozitivne varijante u spolni kromosomima podaci su određeni za rezultat neotkrivanja i rezultat točnih pozitivnih otkrivanja u svakoj vrsti varijante (SNV, umetanje, delecija). Tbl. 21 donosi sažetak opaženih rezultata uz donju i gornju granicu pouzdanosti od 95 % (LCL/UCL) izračunatu pomoću Wilsonove metode za svaku vrstu varijante.

Tbl. 21 Opažanja pri otkrivanjima za spolne kromosome za očekivano pozitivne rezultate po vrsti varijante

Vrsta varijante	Bez otkrivanja			Točno pozitivno otkrivanje				
	Opaženo	Ukupno	Postotak	Opaženo	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Umetanja	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delecije	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Varijante u spolnim kromosomima s razinom VAF-a  $\geq 0,2$  prijavljene su kao negativne (divljeg tipa). Za očekivano negativne lokacije na spolnim kromosomima podaci su određeni za neprepoznavanja i točna prepoznavanja divljeg tipa. Tbl. 22 donosi sažetak opaženih rezultata uz donju i gornju granicu pouzdanosti od 95 % (LCL/UCL) izračunatu pomoću Wilsonove metode.

Tbl. 22 Opažanja pri otkrivanjima za spolne kromosome za očekivano negativne rezultate

Vrsta varijante	Bez otkrivanja			Točno negativno otkrivanje				
	Opaženo	Ukupno	Postotak	Opaženo	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
Divljeg tipa	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Varijante u spolnim kromosomima s razinom VAF-a  $\geq 0,2$  i  $< 0,7$  otkrivaju se kao pozitivne heterozigotne za varijantu, a varijante s razinom VAF-a  $\geq 0,7$  otkrivaju se kao pozitivne homozigotne za varijantu. Upotrijebljeni su uzorci iz spolnih stanica s heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo može li inherentna varijabilnost analize utjecati na otkrivanje genotipa. Utvrđena je vrijednost Cx za obje granične vrijednosti (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udio ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. Za donju graničnu vrijednost od 0,2 VAF-a, Cx je iznosio  $\geq 99,999$  %, što upućuje na to da će se  $\geq 99,999$  % heterozigotnih varijanti prepoznati kao heterozigotne. Imajući u vidu gornju graničnu vrijednost od 0,7 VAF-a, Cx je iznosio  $\geq 0,001$  %, što upućuje na to da će se  $\geq 0,001$  % heterozigotnih varijanti prepoznati kao homozigotne. Tbl. 23 donosi sažetak rezultata po vrsti varijante.

Varijante u spolnim kromosomima s razinom VAF-a  $\geq 0,2$  i  $< 0,7$  otkrivaju se kao pozitivne heterozigotne za varijantu, a varijante s razinom VAF-a  $\geq 0,7$  otkrivaju se kao pozitivne homozigotne za varijantu. Upotrijebljeni su uzorci iz spolnih stanica s heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo može li inherentna varijabilnost analize utjecati na otkrivanje genotipa. Utvrđena je vrijednost Cx za obje granične vrijednosti (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udio ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. Imajući u vidu donju graničnu vrijednost od 0,2 VAF-a, Cx je iznosio  $\geq 99,999$  %, što upućuje na to da će se  $\geq 99,999$  % heterozigotnih varijanti prepoznati kao heterozigotne. Za gornju graničnu vrijednost od 0,7 VAF-a Cx je iznosio  $\geq 0,001$  %, što upućuje na to da će se  $\geq 0,001$  % heterozigotnih varijanti prepoznati kao homozigotne. Tbl. 23 donosi sažetak rezultata po vrsti varijante.

Tbl. 23 Vrijednosti Cx za spolne stanice za heterozigotne varijante

Vrsta varijante	Granična vrijednost za 0,2 VAF-a	Granična vrijednost za 0,7 VAF-a
	$\geq C99,999$ %	$\leq C0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Umetanja	24/24	24/24
Delecije	35/35	35/35
Ukupno	153	153

#### Somatske stanice

Varijante u somatskim kromosomima s razinom VAF-a  $\geq 0,026$  prijavljene su kao pozitivne (varijante). Opažanja s razinama VAF-a  $\geq 0,01$  i  $< 0,026$  u ovoj su analizi smatrana višeznačnima (ni pozitivna ni negativna, označena kao niska učestalost varijante). Da bi se analizirala radna svojstva, rezultati su računati na sljedeća tri načina:

- ▶ najbolji slučaj: svaki višeznačan rezultat smatra se točnim pozitivnim otkrivanjem (u skladu s očekivanim rezultatima)
- ▶ najgori slučaj: svaki višeznačan rezultat smatra se netočnim otkrivanjem (nije u skladu s očekivanim rezultatima)
- ▶ slučaj isključivanja: svaki višeznačan rezultat isključuje se iz analize

Tri tablice, Tbl. 24, Tbl. 25 i Tbl. 26, donose sažetak rezultata otkrivanja za najbolji, najgori i slučaj isključivanja, tim redoslijedom, zajedno s donjim i gornjim razinama pouzdanosti od 95 % (LCL/UCL) izračunatih primjenom Wilsonove metode.

Tbl. 24 Opažanja pri otkrivanjima za somatske kromosome za očekivano pozitivne rezultate prema vrsti varijante (najbolji slučaj)

Vrsta varijante	Točno pozitivno otkrivanje				
	Opaženo	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Umetanja	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delecije	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tbl. 25 Opažanja pri otkrivanjima za somatske kromosome za očekivano pozitivne rezultate prema vrsti varijante (najgori slučaj)

Vrsta varijante	Točno pozitivno otkrivanje				
	Opaženo	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Umetanja	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delecije	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tbl. 26 Opažanja pri otkrivanjima za somatske kromosome za očekivano pozitivne rezultate prema vrsti varijante (uklonjena višeznačna otkrivanja)

Vrsta varijante	Točno pozitivno otkrivanje				
	Opaženo	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Umetanja	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delecije	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Varijante u somatskim kromosomima s razinom VAF-a < 0,01 prijavljene su kao negativna otkrivanja (divljev tipa). Za očekivano negativne lokacije na somatskim kromosomima podaci su određeni za neprepoznavanja i točna prepoznavanja divljev tipa. Točna otkrivanja divljev tipa određena su isključivanjem neprepoznavanja i oduzimanjem opaženih otkrivanja koja su pala u zonu višeznačnosti (razine VAF-a  $\geq 0,01$  i < 0,026) kao i netočnih otkrivanja koja su bila iznad granične vrijednosti (razine VAF-a  $\geq 0,026$ ) iz ukupnog broja. Tbl. 27 donosi sažetak opaženih, ukupnih i postotnih rezultata za negativne somatske lokacije za rezultat neotkrivanja i rezultat točnog otkrivanja divljev tipa zajedno s donjom i gornjom razinom pouzdanosti od 95 % (LCL/UCL) izračunato primjenom Wilsonove metode.

Tbl. 27 Opažanja pri otkrivanjima za somatske kromosome za očekivano negativne rezultate

Vrsta varijante	Bez otkrivanja			Točno otkrivanje						
	Opaženo	Ukupno	Postotak	Višeznačno	Netočno	Točno	Ukupno	Postotak	95 % LCL	95 % UCL
Divljev tipa	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Promatrani su somatski uzorci s različitim razinama VAF-a za istu varijantu radi određivanja C95 analize (u svakoj vrsti varijante). Da bi se odredila varijabilnost blizu granične vrijednosti analize, upotrijebljeni su uzorci s očekivanim vrijednostima VAF-a između 0,02 i 0,07. Određen je C95 za svaku varijantu s najvećom vrijednosti C95 za svaku vrstu varijante navedenom u Tbl. 28.

Tbl. 28 Sažetak C95 za somatske stanice

Vrsta varijante	N	C95
SNV	74	0,0613
Umetanje	24	0,0573
Delecija	33	0,0575

## Radna svojstva kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa)

### Pregled

NextSeq 550Dx podržavaju dva kompleta reagensa: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Da bi se dokazalo da komplet NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) zadovoljava preduvjete analitičkog učinka koje je potvrdio i učinio valjanima

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa), provedena su ispitivanja uz upotrebu kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Izvedene su dvije pripreme biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx: jedna za tijek rada sa spolnim stanicama, a druga s tijekom rada za somatske stanice. Testirane su biblioteke iz svakog tijeka rada trima serijama kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) na trima instrumentima NextSeq 550Dx. Uz to, testiranje za svaki tijek rada obuhvaćalo je jednu obradu kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa).

### Analička osjetljivost (granica praznog uzorka [Limit of Blank, LoB] i granica prepoznavanja [Limit of Detection, LoD])

Provjera kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) pokazala je da instrument NextSeq 550Dx može prepoznati varijante pri 0,05 VAF-a s pogreškom vrste II  $\leq 0,05$  te da granična vrijednost od 0,026 VAF-a koju upotrebljava modul Somatic Variant (zapravo LoB) podržava pogrešku vrste I  $\leq 0,01$ . Na temelju tih saznanja očekuje se da je varijanta pri 0,05 VAF-a veća od ili jednaka 0,026 VAF-a u 95 % slučajeva te da je položaj divljeg tipa manji od 0,026 VAF-a u 99 % slučajeva. Radi sigurnosti da su uz korištenje kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) ti zahtjevi zadovoljeni, provedena su ponovljena mjerenja na instrumentu NextSeq 550Dx s uzorcima divljeg tipa (LoB uzorcima) i uzorcima koji sadrže varijante pri 0,05 VAF-a (LoD uzorci) uz korištenje kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Udio otkrivanja iznad i ispod granične vrijednosti od 0,026 zatim je uspoređen s rezultatima dobivenim korištenjem kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa).

Testiranje je uključivalo dva LoD uzorka s jedinstvenim skupom varijanti ciljanih na 0,05 VAF-a i odgovarajućih LoB uzoraka koji su bili divljeg tipa za ciljane varijante. Za pripremu biblioteka LoD i LoB uzorci bili su obrađeni u replikama od osam i sedam, tim redosljedom, pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteke su bile prvotno sekvencirane pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) radi identifikacije varijanti/genomskih koordinata za LoB/LoD određivanje pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Sve varijante s prosječnim VAF-om između 0,045 i 0,055 (LoD varijante) utemeljene na rezultatima dobivenim korištenjem kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) upotrijebljeni su za LoD analizu (N = 51 varijanti). Prilikom LoB analize analizirana je 51 odgovarajuća genomski koordinata.

Za određivanje kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) biblioteke su sekvencirane kroz tri obrade u tri uzastopna dana pomoću istog instrumenta i serije kompleta reagensa. To je testiranje obuhvatilo 24 replike za svaku od 51 LoD varijanti i 21 repliku za svaki odgovarajući položaj divljeg tipa. Udio otkrivanja divljeg tipa s VAF-om  $< 0,026$  naveden je u Tbl. 29. Udio otkrivanja LoD varijanti s VAF-om većim od ili jednakim 0,026 naveden je u Tbl. 30.

Tbl. 29 Udio otkrivanja  $< 0,026$  za položaje divljeg tipa (određivanje LoB očekivanja)

Vrsta varijante	Određivani položaji	Ukupan broj promatranja	Br. mjerenja VAF-a $\geq 2,6$ %	Udio $< 2,6$ %	Udio 95 % Interval pouzdanosti
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Umetanje	11	231	0	1	0,984 – 1
Delecija	8	168	0	1	0,978 – 1

Tbl. 30 Udio otkrivanja  $\geq 0,026$  VAF-a za LoD varijante (određivanje očekivanog LoD-a)

Vrsta varijante	Određivani položaji	Ukupan broj promatranja	Br. mjerenja VAF-a $< 2,6$ %	Br. mjerenja VAF-a $\geq 2,6$ %	Udio $\geq 2,6$ %	Udio 95 % Interval pouzdanosti
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Umetanje	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delecija	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

## Točnost

### Spolne stanice

Sljedeće ispitivanje provedeno je radi procjene točnosti otkrivanja varijanti s modulom Germline Variant pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Testirano je dvanaest jedinstvenih uzoraka iz „platinastog genoma“ pomoću reprezentativne analize. Izvedeno je ukupno 11 obrada na tri instrumenta NextSeq 550Dx i tri kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).

Utvrđena je točnost za SNV-ove, umetanja i delecije usporedbom rezultata s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita, verzije „platinastog genoma“ 2016-1.0. Rezultati točnosti jedne obrade sekvenciranjem s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) navedeni su kao referenca. Sažetak rezultata naveden je u [Tbl. 31](#).

Tbl. 31 Sažetak slaganja za spolne stanice

Kriteriji	Ukupan broj promatranja (v2.5) <sup>1</sup>	Rezultat dobiven promatranjem (v2.5) <sup>2</sup>	Rezultat dobiven promatranjem (v2) <sup>3</sup>	Rezultat dobiven obradom (v2.5) <sup>4</sup>	Rezultat dobiven obradom (v2) <sup>4</sup>
PPA za SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA za umetanja	1056	100	100	100	98,9
PPA za delecije	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>Izračunato kao broj uzoraka po obradi x broj obrada (96 uzoraka po obradi x 11 obrada = 1056 promatranja).

<sup>2</sup>Najniža opažena vrijednost po replici uzorka za sve obrade (na temelju 11 obrada pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Najniža opažena vrijednost prema replici uzorka za 1 obradu (ukupno 96 opažanja).

<sup>4</sup>Najmanja vrijednost kad se podaci iz svake obrade agregatno analiziraju.

### Somatske stanice

Sljedeće ispitivanje provedeno je radi procjene točnosti otkrivanja varijanti modula Somatic Variant na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Pomoću reprezentativne analize testirano je deset FFPE uzoraka „platinastog genoma“ (dva s varijantama razrijeđenim na 0,05 VAF). Izvedeno je ukupno 11 obrada primjenom tri instrumenta NextSeq 550Dx i tri serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).

Utvrđena je točnost za SNV-ove, umetanja i delecije usporedbom rezultata s referentnom metodom dobro okarakteriziranog kompozita, verzije „platinastog genoma“ 2016-1.0. Rezultati točnosti jedne obrade sekvenciranjem s kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) navedeni su kao referenca. Sažetak rezultata naveden je u [Tbl. 32](#).

Tbl. 32 Sažetak somatskog slaganja

Kriteriji	Ukupan broj promatranja (v2.5) <sup>1</sup>	Rezultat dobiven promatranjem (v2.5) <sup>2</sup>	Rezultat dobiven promatranjem (v2) <sup>3</sup>	Rezultat dobiven obradom (v2.5) <sup>4</sup>	Rezultat dobiven obradom (v2) <sup>4</sup>
PPA za SNV	528	100	100	100	100
PPA za umetanja	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9



PPA za delecije	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>Izračunato kao broj uzoraka po obradi x broj obrada (48 uzoraka po obradi x 11 obrada = 528 promatranja).

<sup>2</sup>Najniža opažena vrijednost po replici uzorka za sve obrade (na temelju 11 obrada pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Najniža opažena vrijednost prema replici uzorka za 1 obradu (ukupno 96 opažanja).

<sup>4</sup>Najmanja vrijednost kad se podaci iz svake obrade agregatno analiziraju.

## Preciznost

### Spolne stanice

Preciznost kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) s modulom Germline Variant određena je pomoću uzoraka iz „platinastog genoma“ i reprezentativne analize. Testiranje se sastojalo od pripreme jedne biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i obuhvaćalo je obradu 12 uzoraka, svaki s osam replika. Biblioteke su sekvencirane pomoću tri serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) i tri instrumenta NextSeq 550Dx radi ukupno devet obrada sekvenciranjem.

Upotrijebljeni su uzorci s heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo može li inherentna varijabilnost analize utjecati na otkrivanje genotipa (N = 153 jedinstvene heterozigotne varijante). Utvrđena je vrijednost Cx za obje granične vrijednosti modula Germline Variant (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udio ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. Za donju graničnu vrijednost od 0,2 VAF-a varijanta s minimalnom vrijednosti Cx za komplet NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) iznosila je > 99,9 %, što znači da bi se > 99,9 % heterozigotnih varijanti prepoznalo kao heterozigotne. Za gornju graničnu vrijednost od 0,7 VAF-a varijanta s maksimalnom vrijednosti Cx za komplet NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) iznosila je < 1,5 %, što znači da bi se ≤ 1,5 % heterozigotnih varijanti prepoznalo kao homozigotne. Tbl. 33 donosi sažetak rezultata po vrsti varijante. Vrijednosti Cx dobivene jednom obradom sekvenciranjem pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) navedene su kao reference.

Tbl. 33 Vrijednosti Cx za spolne stanice za heterozigotne varijante

Vrsta varijante	N	Granična vrijednost za 0,2 VAF-a		Granična vrijednost za 0,7 VAF-a	
		Min Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Min Cx (v2) <sup>2</sup>	Max Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Max Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Umetanja	24	100 %	100 %	0%	< 0,1 %
Delecije	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

<sup>1</sup>Utvrđene vrijednosti Cx na temelju procjena ukupne standardne devijacije iz analize varijance komponenti.

<sup>2</sup>Vrijednosti Cx utemeljene na standardnim devijacijama uzoraka.

### Somatske stanice

Preciznost kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) s modulom Somatic Variant određena je pomoću FFPE uzoraka iz „platinastog genoma“ i reprezentativne analize. Testiranje se sastojalo od pripreme jedne biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i obuhvaćalo je dva uzorka, svaki s osam replika. Biblioteke su sekvencirane pomoću tri serije kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) i tri instrumenta NextSeq 550Dx radi ukupno devet obrada sekvenciranjem.

Somatske varijante s očekivanim razinama VAF-a ≤ 0,10 VAF (N = 131 jedinstvena varijanta) upotrijebljene su za određivanje varijabilnosti instrumenta blizu granice VAF-a za modul Somatic Variant (somatske varijante s razinom VAF-a ≥ 0,026 određuju se kao pozitivne na varijantu). Za svaku somatsku varijantu određene su vrijednosti C95. Vrijednosti C95 predstavljaju VAF kod kojega vjerojatnost da je veći od granice VAF-a za modul Somatic Variant

iznosi 95 %. Najveće vrijednosti C95 prema vrsti varijante navedene su u Tbl. 34. Rezultati C95 dobiveni jednom obradom sekvenciranjem pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) navedeni su kao referenca.

Tbl. 34 Sažetak C95 za somatske stanice

Vrsta varijante	Br. određenih varijanti	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Umetanja	24	0,062	0,061
Delecije	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>Utvrđene vrijednosti C95 na temelju procjena ukupne standardne devijacije iz analize varijance komponenti.

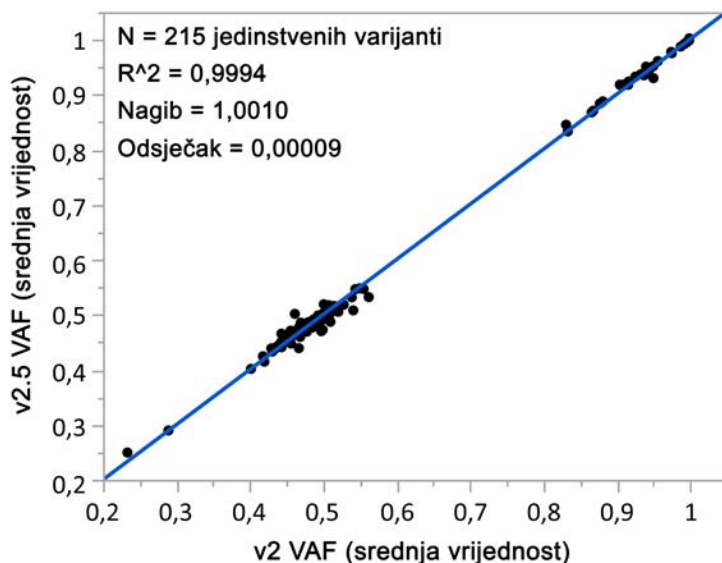
<sup>2</sup>Vrijednosti C95 utemeljene na standardnim devijacijama uzoraka.

## Usporedba metoda (komplet reagensa)

### Spolne stanice

Prosječne vrijednosti VAF-a iz 215 jedinstvenih varijanti utvrđene su pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) i rezultata generiranih modulom Germline Variant. Izračunate su prosječne vrijednosti VAF-a na temelju 11 obrada sekvenciranjem (v2.5) i jedne obrade sekvenciranjem (v2). Upotrijebljeno je barem osam replika za izračun prosjeka za svaku jedinstvenu varijantu. Na Sl. 3 prikazana je korelacija VAF-a između dva kompleta reagensa. Na temelju snažne lineare korelacije VAF-a i sličnosti rezultata dobivenih pomoću oba kompleta reagensa utvrđeno je da su karakteristike radnih svojstava, prvotno provjerene i potvrđene kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) s modulom Germline Variant, primjenjive na NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).

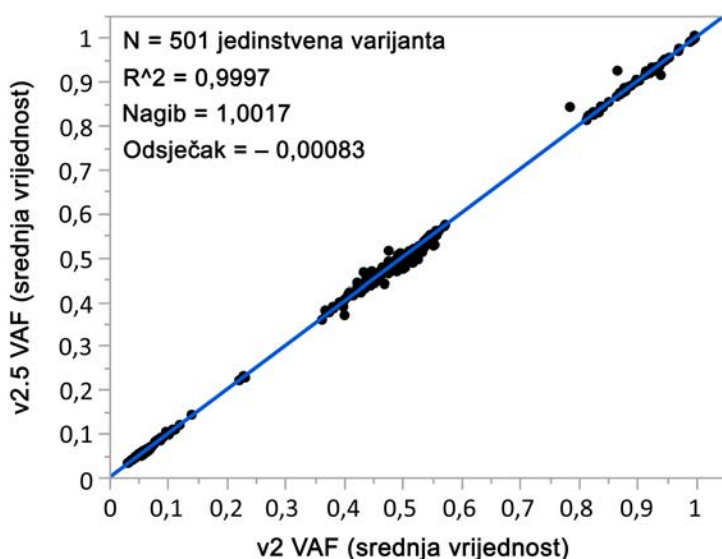
Sl. 3 Korelacija učestalosti alelnih varijanti (Variant Allele Frequency, VAF) modula Germline Variant između kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).



## Somatske stanice

Prosječne vrijednosti VAF-a za 501 jedinstvenu varijantu utvrđene su pomoću kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) i rezultata generiranih modulom Somatic Variant. Izračunate su prosječne vrijednosti VAF-a na temelju 11 obrada sekvenciranjem (v2.5) i jedne obrade sekvenciranjem (v2). Upotrijebljene su barem tri replike za izračun prosjeka za svaku jedinstvenu varijantu. Na **Sl. 4** prikazana je korelacija VAF-a između dva kompleta reagensa. Na temelju korelacije VAF-a i sličnosti rezultata dobivenih pomoću oba kompleta reagensa utvrđeno je da su karakteristike radnih svojstava, provjerene i potvrđene kompletom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) s modulom Somatic Variant, primjenjive na NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).

Sl. 4 Korelacija učestalosti alelnih varijanti (Variant Allele Frequency, VAF) modula Somatic Variant između kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa).



## Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodima opisanima u njemu. Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licence zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano i odgovarajuće obučeno osoblje mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

**AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVODE.**

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI SU OPISANI U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TIH PROIZVODA I SOFTVER).

© 2021. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili svojih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Podaci za kontakt



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 SAD  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### **Australski sponzor**

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

## Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se mogu pojaviti na pakiranju i naljepnicama proizvoda potražite u legendi simbola na web-mjestu [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na kartici *Dokumentacija i literatura* vašeg kompleta.