

Prístroj NextSeq™ 550Dx

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

Katalógové č. 20005715

Zamýšľané použitie

Prístroj NextSeq 550Dx je určený na sekvenovanie DNA knižníc pri diagnostických rozboroch *in vitro*. Prístroj NextSeq 550Dx sa má používať so špecificky registrovanými, certifikovanými alebo schválenými diagnostickými reagensiami *in vitro* a analytickým softvérom.

Zásady postupu

Prístroj Illumina NextSeq 550Dx je určený na sekvenovanie DNA knižníc pri diagnostických rozboroch *in vitro*. Na prístroji NextSeq 550Dx sa ako vstupy používajú knižnice vytvorené z DNA, kde sa indexy vzoriek a zachytené sekvencie pripájajú k amplifikovaným cieľom. Knižnice vzoriek sa zachytia na prietokovom článku a sekvenujú sa na prístroji pomocou procesu sekvenovania syntézou (Sequencing by Synthesis, SBS). Technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora deteguje jednotlivé fluorescenčne značené nukleotidové bázy tak, ako sa začleňujú do rastúceho reťazca DNA. Softvér na analýzu v reálnom čase (Real-Time Analysis, RTA) vykoná analýzu snímok a primárnu analýzu báz a každej báze priradí za každý sekvenovací cyklus skóre kvality. Po dokončení primárnej analýzy sa môže na prístroji vykonať sekundárna analýza na účely spracovania primárnych analýz báz. V závislosti od pracovného postupu prístroj NextSeq 550Dx využíva na sekundárnu analýzu rôzne moduly. V prípade modulov na analýzu germinálnych alebo somatických variantov spracúvanie zahŕňa demultiplexovanie, generovanie súborov FASTQ, zarovnanie, primárnu analýzu variantov a generovanie súborov vo formáte primárnej analýzy variantov (VCF a gVCF). Súbor VCF a gVCF obsahujú informácie o variantoch nájdených na špecifických pozíciách v referenčnom genóme.

Konfigurácia duálneho opätovného spustenia

Prístroj NextSeq 550Dx obsahuje konfiguráciu duálneho opätovného spustenia, ktorá umožňuje jeho používanie buď v diagnostickom režime (Dx), alebo v režime iba na výskumné účely (RUO). Diagnostické sekvenčné rozborové *in vitro* zahŕňajúce moduly na analýzu germinálnych a somatických variantov sa vykonávajú v diagnostickom režime. V diagnostickom režime sa môžu používať iba sekvenčné reagensie IVD. Výkonnostné charakteristiky a obmedzenia postupu prístroja NextSeq 550Dx sa stanovili v diagnostickom režime pomocou modulov na analýzu germinálnych a somatických variantov.

Obmedzenia postupu

- 1 Na diagnostické účely *in vitro*.
- 2 Keď sa moduly na analýzu germinálnych a somatických variantov používajú so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) alebo NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov), dokážu poskytnúť:
 - ▶ sekvenovací výkon ≥ 90 gigabáz (Gb),
 - ▶ dĺžku čítania (pri chode s čítaním z oboch koncov) 2 x 150 párov báz (bp),
 - ▶ bázy s veľkosťou najmenej Q30 ≥ 75 % pri dĺžke čítania 2 x 150 bp, najmenej 75 % báz má kvalitatívne skóre Phred ≥ 30 , čo znamená, že správnosť primárnej analýzy báz je väčšia ako 99,9 %.

- 3 Čítania s indelmi (inzeriami, deléciami alebo ich kombináciami), kde dĺžka obsahu predstavuje > 25 bp, rozborový softvér nezarovnáva. V dôsledku toho rozborový softvér nedokáže detegovať indely s dĺžkou > 25 bp.
- 4 Rozborový softvér nemusí zarovnať čítanie amplicónov s extrémnym obsahom variantov, v dôsledku čoho sa oblasť zapíše ako oblasť divokého typu. Takýto extrémny obsah zahŕňa:
 - ▶ čítania obsahujúce viac ako tri indely,
 - ▶ čítania s dĺžkou aspoň 30 bp s obsahom jednonukleotidového variantu (SNV) > 4 % celkovej cieľovej dĺžky amplicónu (okrem oblastí so sondami)
 - ▶ čítania s dĺžkou < 30 bp s obsahom SNV > 10 % celkovej dĺžky amplicónu (vrátane oblastí so sondami)
- 5 Veľké varianty vrátane multinukleotidových variantov (MNV) môžu byť vo výstupnom súbore VCF zapísané ako samostatné malé varianty.
- 6 Varianty delécie možno filtrovať alebo vynechať pri preklenovaní dvoch dlaždicových amplicónov, ak je dĺžka delécie väčšia ako prekrytie medzi dlaždicovými amplicónmi alebo je rovnaká ako toto prekrytie.
- 7 Systém nedokáže detegovať indely, ak priamo susedia s primérom a nenachádza sa tam žiadny prekrývajúci sa amplicón. V prípade prekrývajúcich sa amplicónov rozborový softvér nedokáže detegovať delécie, keď je oblasť prekrytia menšia ako veľkosť delécie, ktorá sa má detegovať. Napríklad ak oblasť prekrytia medzi dvoma susediacimi amplicónmi predstavuje dve bázy, rozborový softvér nedokáže detegovať žiadne delécie vrátane týchto dvoch báz. Možno detegovať deléciu jednej bázy na jednej z týchto báz.
- 8 Ako v prípade akéhokoľvek pracovného postupu na prípravu knižnice na základe hybridizácie môžu základné polymorfizmy, mutácie, inzercie alebo delécie v oblastiach viazania oligonukleotidov ovplyvniť sondované alely a primárne analýzy vykonávané počas sekvenovania. Napríklad:
 - ▶ Variant vo fáze s variantom v oblasti priméra sa nemusí amplifikovať, čo bude mať za následok falošnú negatívu.
 - ▶ Varianty v oblasti priméra by mohli zabrániť amplifikácii referenčnej alely, čo bude mať za následok nesprávnu primárnu analýzu homozygotných variantov.
 - ▶ Varianty indelov v oblasti priméra môžu spôsobiť falošnú pozitívnu primárnu analýzu na konci čítania susediaceho s primérom.
- 9 Ak sa indely vyskytnú v blízkosti konca jedného čítania a počas zarovnávanía sa dočasne pripnú, môžu sa v dôsledku nečistôt z reťazca filtrovať.
- 10 Malé multinukleotidové varianty (MNV) sa nepotvrdia a zapíšu sa iba v module na analýzu somatických variantov.
- 11 Delécie sa zapíšu vo VCF na súradnici predchádzajúcej báze podľa formátu VCF. Preto pred zápisom, že primárna analýza jednotlivé bázy je homozygotnou referenciou, zohľadnite susediace varianty.
- 12 Germinálno-špecifické obmedzenia:
 - ▶ Prístroj NextSeq 550Dx, ktorý využíva modul softvéru Local Run Manager na analýzu germinálnych variantov pre NextSeq 550Dx, je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov primárnej analýzy germinálnych variantov (napr. homozygotných, heterozygotných, divokého typu).
 - ▶ Pri použití s modulom na analýzu germinálnych variantov je na správnu primárnu analýzu variantov potrebné minimálne pokrytie 150x. V dôsledku toho je potrebných 150 podporujúcich fragmentov DNA, čo sa rovná 300 prekrývajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cieľných báz. Pokrytie môže byť ovplyvnené obsahom GC a iným genomickým obsahom.
 - ▶ To, či bude variant identifikovaný ako homozygotný alebo heterozygotný, môže byť ovplyvnené variabilitou počtu kópií.
 - ▶ Varianty v určitom opakujúcom sa kontexte sa vyfiltrujú do súborov VCF. Filter opakovania RMxN sa používa na filtrovanie variantov, pokiaľ sa v referenčnom genóme vedľa pozície variantu opakovane vyskytuje celá sekvencia variantu alebo jej časť. Pri primárnej analýze germinálnych variantov je na filtrovanie variantu potrebných aspoň deväť opakovaní v referencii. Zohľadňujú sa len opakovania s dĺžkou maximálne 5 bp (R5 x 9).
 - ▶ Indel a SNV na jednom lokuse môžu vyústiť do zápisu len jedného variantu.

13 Somaticko-špecifické obmedzenia:

- ▶ Prístroj NextSeq 550Dx, ktorý využíva modul softvéru Local Run Manager na analýzu somatických variantov pre NextSeq 550Dx, je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov primárnej analýzy somatických variantov (napr. prítomnosti somatického variantu s frekvenciou variantu minimálne 0,026 s medzou detekcie 0,05).
- ▶ Pri použití s modulom na analýzu somatických variantov je na správnu primárnu analýzu variantov potrebné minimálne pokrytie 450x na skupinu oligonukleotidov. V dôsledku toho je potrebných 450 podporujúcich fragmentov DNA na skupinu oligonukleotidov, čo sa rovná 900 prekrývajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cielených báz. Pokrytie môže byť ovplyvnené obsahom GC a iným genomickým obsahom.
- ▶ Pri primárnej analýze somatických variantov je na filtrovanie variantu potrebných aspoň šesť opakovaní v referencii a zohľadňujú sa len opakovania s dĺžkou maximálne 3 bp (R3 x 6).
- ▶ Modul na analýzu somatických variantov nedokáže rozlišovať medzi germinálnymi a somatickými variantmi. Modul je určený na detegovanie variantov v celom rade frekvencií variantov, frekvenciu variantov však nemožno použiť na odlíšenie somatických variantov od germinálnych variantov.
- ▶ Detekciu variantov ovplyvňuje normálne tkanivo vo vzorke. Zapísaná medza detekcie je založená na frekvencii variantov vzhľadom na celkovú DNA extrahovanú z nádoru aj z normálneho tkaniva.

Komponenty produktu

- 1 prístroj NextSeq 550Dx (katalógové č. 20005715)
- 2 softvérové komponenty prístroja NextSeq 550Dx vrátane týchto súčastí:

Softvérová aplikácia	Funkcia	Popis
Operačný softvér NextSeq 550Dx (NOS)	Ovláda používanie prístroja	Softvérová aplikácia NOS riadi prevádzku prístroja počas sekvenovania a vytvára snímky na použitie softvérom na analýzu v reálnom čase (RTA).
Softvér na analýzu v reálnom čase (RTA)	Vykonáva primárnu analýzu	Softvérová aplikácia RTA konvertuje snímky, ktoré vytvára NOS pre každú dlaždicu a cyklus sekvenovacieho chodu, na súbory primárnej analýzy, ktoré sú vstupmi pre analytické moduly softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov). Softvérová aplikácia RTA neobsahuje používateľské rozhranie.
Local Run Manager (Správca lokálnych chodov)	Rozhranie na výber modulu	Softvér Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) je riešenie na správu používateľov, výber vhodného analytického modulu a monitorovanie stavu, ktoré je integrované priamo do prístroja.
Modul na analýzu somatických variantov	Vykonáva sekundárnu analýzu	Tento analytický modul softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) spracúva primárne analýzy báz prostredníctvom sekundárnej analýzy. Spracúvanie zahŕňa demultiplexovanie, generovanie súborov FASTQ, zarovnávanie, vykonávanie primárnej analýzy variantov a zápis. Program na primárnu analýzu variantov (Pisces) generuje súbory VCF, ktoré obsahujú informácie o variantoch nájdených na určitých pozíciách v referenčnom genóme, a zahŕňa nameranú frekvenciu variantov.
Modul na analýzu germinálnych variantov	Vykonáva sekundárnu analýzu	Tento analytický modul softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) spracúva primárne analýzy báz prostredníctvom sekundárnej analýzy. Spracúvanie zahŕňa demultiplexovanie, generovanie súborov FASTQ, zarovnávanie, vykonávanie primárnej analýzy variantov a zápis. Program na primárnu analýzu variantov (Pisces) generuje súbory VCF, ktoré obsahujú informácie o variantoch nájdených na určitých pozíciách v referenčnom genóme, a každý variant identifikuje ako heterozygotný alebo homozygotný.

Prevádzkové podmienky

Prvok	Špecifikácia
Teplota	Udržujte laboratórnu teplotu 19 °C až 25 °C (22 °C ±3 °C). Táto teplota je prevádzkovou teplotou prístroja. Počas prevádzky nedovoľte zmenu teploty prostredia o viac ako ±2 °C.
Vlhkosť	Udržujte nekondenzujúcu relatívnu vlhkosť v rozmedzí 20 – 80 %.

Vybavenie a materiály

Potrebné vybavenie a materiály, ktoré sa predávajú samostatne

Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov), katalógové č. 20019554

Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov), katalógové č. 20028871

Potrebné vybavenie a materiály, ktoré nie sú súčasťou dodávky

Spotrebný materiál dodávaný používateľom na sekvenovacie chody

Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
Alkoholové utierky, 70 % izopropyl alebo etanol, 70 %	VWR, katalógové č. 95041-714 (alebo ekvivalent) Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Čistenie prietokového článku a všeobecné použitie
Laboratórna tkanina bez vlákien	VWR, katalógové č. 21905-026 (alebo ekvivalent)	Čistenie prietokového článku a všeobecné použitie

Spotrebný materiál dodávaný používateľom na údržbu prístroja

Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
NaOCl, 5 % (chlórnan sodný)	Sigma-Aldrich, katalógové č. 239305 (alebo laboratórny ekvivalent)	Prepláchnutie prístroja pomocou manuálneho prepláchnutia po ukončení chodu; zriedené na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalógové č. P7949	Prepláchnutie prístroja pomocou možností manuálneho prepláchnutia; zriedené na 0,05 %
Laboratórna voda	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Preplachovanie prístroja (manuálne preplachovanie)
Vzduchový filter	Illumina, katalógové č. 20022240	Čistenie vzduchu, ktorý prístroj privádza na chladenie

Usmernenia pre laboratórnu vodu

Na vykonávanie postupov súvisiacich s prístrojom vždy používajte laboratórnu alebo deionizovanú vodu. Nikdy nepoužívajte vodu z vodovodu. Používajte iba tieto druhy vody alebo ekvivalenty:

- ▶ deionizovaná voda,
- ▶ Illumina PW1,
- ▶ voda s odporom 18 megaohmov (MΩ),
- ▶ voda Milli-Q,
- ▶ voda Super-Q,

- ▶ voda na molekulárnu biológiu.

Varovania a bezpečnostné opatrenia



UPOZORNENIE

Podľa federálnych právnych predpisov môže toto zariadenie predávať len lekár alebo iný odborník s licenciou podľa právnych predpisov štátu, v ktorom vykonáva svoju odbornú prax.

- 1 **Niektoré komponenty reagensí dodávané spoločnosťou Illumina na použitie s prístrojom NextSeq 550Dx obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášt'a, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo expozície. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi.** Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov na stránke support.illumina.com/sds.html.
- 2 So všetkými vzorkami krvi zaobchádzajte tak, akoby boli infikované ľudským vírusom nedostatočnej imunity (HIV), ľudským vírusom hepatitídy B (HBV) a ďalšími krvnými patogénmi (univerzálne bezpečnostné opatrenia).
- 3 Nedodržanie stanovených postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo k významnému zníženiu kvality vzorky.
- 4 Používajte rutinné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Nepipetujte ústami. Vo vyhradených pracovných priestoroch nejedzte, nepite ani nefajčite. Pri manipulácii so vzorkami a súpravami reagensí používajte jednorazové rukavice a laboratórne plášte. Po manipulácii so vzorkami a súpravami reagensí si dôkladne umyte ruky.
- 5 Dodržiavajte správne laboratórne postupy a dobrú laboratórnu hygienu, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, nástrojov a genomických vzoriek DNA produktmi PCR. Kontaminácia PCR môže spôsobiť nepresné a nespoľahlivé výsledky.
- 6 Aby nedošlo ku kontaminácii, priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia mať špecializované vybavenie a spotrebný materiál (napr. pipety, špičky pipiet, tepelné bloky, vortexery a centrifúgy).
- 7 Párovanie indexov so vzorkami sa musí presne zhodovať s vytlačeným rozložením dosky. Softvér Local Run Manager automaticky vyplní indexové priméry súvisiace s názvami vzoriek, keď sa zadajú do modulu. Odporúča sa, aby používateľ pred spustením sekvenovacieho chodu overil spojenie indexových primérov a vzoriek. Nezhody medzi vzorkami a rozložením dosky vyústia do nesprávnej identifikácie pozitívnych vzoriek a nesprávneho vykázania výsledkov.
- 8 Dôrazne sa odporúča, aby si používateľ nainštaloval antivírusový softvér, ktorým sa počítač ochráni pred vírusmi. Návod na inštaláciu nájdete v používateľskej príručke.
- 9 Prístroj NextSeq 550Dx nepoužívajte, ak bol ktorýkoľvek z jeho panelov odstránený. Ak bol ktorýkoľvek z panelov odstránený, vzniká pri použití prístroja riziko potenciálneho vystavenia sieťovému napätiu a jednosmernému napätiu.
- 10 Nedotýkajte sa plochy prietokového článku v priečinku na prietokový článok. Ohrievač v tomto priečinku funguje pri teplote od 22 °C do 95 °C a môže spôsobiť popálenie.
- 11 Prístroj váži cca 84 kg a ak spadne alebo sa s ním nesprávne manipuluje, môže spôsobiť vážne poranenie.

Návod na použitie

Tento návod na použitie slúži na spustenie modulov na analýzu germinálnych a somatických variantov v diagnostickom režime na prístroji NextSeq 550Dx pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) alebo NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

Zadanie informácií o chode

Podrobné pokyny nájdete v referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513) a príslušnom sprievodcovi modulu Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).

Nastavenie parametrov

- 1 Prihláste sa do softvéru Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).
- 2 Vyberte možnosť **Create Run** (Vytvoriť chod) a vyberte položku **Somatic Variant** (Somatický variant) alebo **Germline Variant** (Germinálny variant).
- 3 Zadajte názov chodu, ktorý identifikuje chod od sekveovania až po analýzu. Použite alfanumerické znaky, medzery, podčiarknutia alebo pomlčky.
- 4 **[Voliteľné]** Na lepšiu identifikáciu chodu zadajte popis chodu. Použite alfanumerické znaky, medzery, podčiarknutia alebo pomlčky.
- 5 V rozbaľovacom zozname vyberte počet vzoriek a skupinu indexov. Pri výbere vezmite do úvahy nasledujúce informácie.
 - ▶ Rozbaľovací zoznam obsahuje počty vzoriek so skupinou indexov. Napríklad 24-Set 1 označuje 24 vzoriek určených na testovanie s indexmi zo skupiny indexov 1.
 - ▶ Čísla skupín indexov sa vzťahujú na rôzne skupiny párov indexov i5 a i7. Skupina 1 aj skupina 2 poskytujú rozmanitosť indexov. Aby sa zabránilo vyčerpaniu jednej skupiny, ponúkajú sa dve skupiny indexov.
 - ▶ Vyberte počet vzoriek, ktorý je najbližší počtu vzoriek, ktoré testujete. Ak sa v zozname nenachádza potrebný presný počet vzoriek, vyberte najbližší počet, avšak nižší, ako je počet, ktorý testujete. Ak chcete napríklad 18 vzoriek, vyberte 16 vzoriek.
 - ▶ Navrhnuté jamky na vzorky a kombinácie indexov, ktoré spĺňajú požiadavky na rozmanitosť indexov, sú zvýraznené na zeleno.

Importovanie súborov manifestov na chod

- 1 Manifesty, ktoré chcete importovať, musia byť dostupné na prístupnom mieste v sieti alebo na USB disku.
- 2 Vyberte možnosť **Import Manifests** (Importovať manifesty).
- 3 Prejdite do súboru manifestov a vyberte manifesty, ktoré chcete pridať.



POZNÁMKA

Aby boli súbory manifestov dostupné pre všetky chody s použitím modulov na analýzu germinálnych alebo somatických variantov, manifesty pridajte pomocou funkcie Module Settings (Nastavenia modulu). Na používanie tejto funkcie sú potrebné povolenia na úrovni používateľa s oprávneniami správcu. Ďalšie informácie nájdete v *referenčnej príručke prístroja NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

Špecifikácia vzoriek na chod


Pomocou jednej z nasledujúcich možností a pokynov špecifikujte vzorky na daný chod.

- ▶ **Manuálne zadanie vzoriek** – Použite prázdnu tabuľku na obrazovke Create Run (Vytvoriť chod).
- ▶ **Importovanie vzoriek** – Prejdite do externého súboru vo formáte s hodnotami oddelenými čiarkami (*.csv). Na obrazovke Create Run (Vytvoriť chod) je k dispozícii šablóna na stiahnutie.


Manuálne zadanie vzoriek

- 1 Zadajte jedinečný názov vzorky (**modul na analýzu somatických variantov**) alebo ID vzorky (**modul na analýzu germinálnych variantov**). Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo podčiarknutia.
- 2 **[Voliteľné]** Pri pozitívnych alebo negatívnych kontrolných vzorkách kliknite pravým tlačidlom myši a vyberte typ kontroly. Kontrola v jednej jamke na vzorku automaticky vyplní zodpovedajúcu jamku v druhej skupine s rovnakou kontrolou.
- 3 **[Voliteľné]** Do poľa Sample Description (Popis vzorky) zadajte popis vzorky. Použite alfanumerické znaky, pomlčky alebo podčiarknutia.
- 4 V rozbaľovacom zozname Index 1 (i7) vyberte adaptér Indexu 1. Ak použijete navrhnuté jamky vzoriek, softvér automaticky vyplní indexové adaptéry i7 a i5, ktoré spĺňajú požiadavky na diverzitu indexov. Ak v zozname nie je uvedený presný počet vzoriek, ktoré testujete, vyberte

indexové adaptéry pre extra jamky.

- 5 V rozbaľovacom zozname Index 2 (i5) vyberte adaptér Indexu 2.
- 6 V rozbaľovacom zozname Manifest vyberte súbor manifestov.
Pre vzorky v skupine A je potrebný iný manifest ako pre vzorky v skupine B.
- 7 Vyberte možnosť na zobrazenie, tlač alebo uloženie rozloženia dosky ako referenciu na prípravu knižníc:
 - Výberom ikony  **Print** (Tlač) si zobrazíte rozloženie dosky. Vyberte možnosť **Print** (Tlač) a rozloženie dosky si vytlačíte.
 - Vyberte možnosť **Export** (Exportovať) a informácie o vzorke exportujte do externého súboru.
- 8 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

Importovanie vzoriek

- 1 Vyberte možnosť **Import Samples** (Importovať vzorky) a prejdite na umiestnenie súboru s informáciami o vzorkách. Importovať môžete dva typy súborov.
 - Na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) vyberte možnosť **Template** (Templát) a vytvorte nové rozloženie dosky. Súbor templátu obsahuje správne hlavičky stĺpcov na import. Do každého stĺpca zadajte údaje o vzorkách v chode. Z nepoužitých políčok odstráňte vzorové údaje a potom súbor uložte.
 - Pomocou funkcie Export (Exportovať) použite súbor s údajmi o vzorkách, ktorý sa exportoval z modulu na analýzu germinálnych alebo somatických variantov.
- 2 Výberom ikony  **Print** (Tlač) si zobrazíte rozloženie dosky.
- 3 Vyberte možnosť **Print** (Tlač) a vytlačte rozloženie dosky ako referenciu na prípravu knižníc.
- 4 Vyberte možnosť **Save Run** (Uložiť chod).

Príprava kazety s reagensiami

Úspešné sekvenovanie je podmienené dôsledným dodržiavaním pokynov týkajúcich sa kazety s reagensiami.

- 1 Vyberte kazetu s reagensiami z miesta uskladnenia s teplotou od -25 °C do -15 °C .
- 2 Rozmrazenie reagensí vykonajte pomocou jednej z týchto metód. Kazetu neponárajte. Kazetu po rozmrazení najprv osušte a až potom prejdite na ďalší krok.

Teplota	Čas rozmrazenia	Limit stability
Vodný kúpeľ s teplotou 15 °C až 30 °C	60 minút	Najviac 6 hodín
2 °C až 8 °C	7 hodín	Najviac 5 dní



POZNÁMKA

Ak sa v jednom vodnom kúpeli rozmrazuje viacero kaziet, nechajte ich rozmrazovať dlhšie.

- 3 Kazetu päťkrát prevráťte, aby ste zmiešali reagensie.
- 4 Kontrolou spodnej časti kazety sa presvedčte, či sú reagensie rozmrazené a či sa v nich nenachádzajú zrazeniny. Presvedčte sa, či sú pozície 29, 30, 31 a 32 rozmrazené, keďže sú najväčšie a ich rozmrazenie trvá najdlhšie.
- 5 Jemným poklepaním o stôl zmenšíte množstvo vzduchových bubliniek.
Najlepšie výsledky sa dosiahnu vtedy, keď sa prejde priamo na načítanie vzorky a nastavenie chodu.

Príprava prietokového článku

- 1 Vyberte škatuľu s novým prietokovým článkom z miesta jeho uchovávania pri teplote 2 °C až 8 °C .
- 2 Zo škatule odstráňte fóliový obal a nechajte ju postáť pri izbovej teplote 30 minút.

Príprava knižníc na sekvenovanie

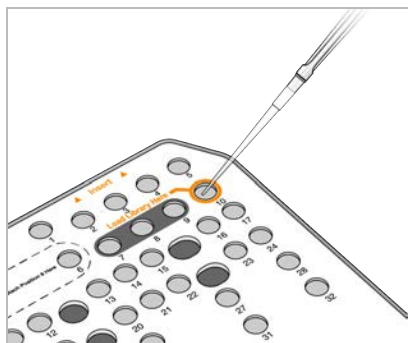
Knižnice denaturujte a zriedte na objem nanášania 1,3 ml. Koncentrácia nanášania sa v skutočnosti môže líšiť v závislosti od prípravy knižnice a kvantifikačných metód. Zriedenie kontrolných knižníc závisí od zložitosti

oligonukleotidových skupín. Pokyny na prípravu kontrolných knižníc na sekvenovanie vrátane zriedovania a zoskupovania knižníc nájdete v návode na použitie príslušnej súpravy na prípravu knižníc. Hustotu klastrov v prístroji NextSeq 550Dx je potrebné optimalizovať.

Zasunutie knižníc do kazety s reagensiami

- 1 Tkaninou bez vlákien vyčistite fóliové tesnenie pokrývajúce zásobník č. 10 s označením **Load Library Here** (Sem zasunúť knižnicu).
- 2 Tesnenie prepichnete čistou špičkou 1 ml pipety.
- 3 Zasuňte 1,3 ml pripravených knižníc do zásobníka č. 10 s označením **Load Library Here** (Sem zasunúť knižnicu). Pri vyberaní knižníc sa nedotýkajte fóliového tesnenia.

Obrázok 1 Zasunutie knižníc



Nastavenie sekvenovacieho chodu

- 1 Prihláste sa do prístroja NextSeq 550Dx pomocou hesla, ktoré používate pri softvéri Local Run Manager.
- 2 Na domovskej obrazovke softvéru NOS vyberte možnosť **Sequence** (Sekvenovať).
- 3 V zozname vyberte chod a potom vyberte možnosť **Next** (Ďalej).
Zobrazí sa rad obrazoviek nastavenia chodu v tomto poradí: Load Flow Cell (Zasunutie prietokového článku), Load Buffer Cartridge (Zasunutie kazety s pufrom), Load Reagent Cartridge (Zasunutie kazety s reagentmi) a Pre-run Check (Kontrola pred spustením chodu).
- 4 Keď sa zobrazí obrazovka Load Flow Cell (Zasunutie prietokového článku), očistite a zasuňte prietokový článok.
 - ▶ Vyberte prietokový článok z fóliového obalu.
 - ▶ Otvorte priehľadný plastový uzatvárací obal a vyberte prietokový článok.
 - ▶ Sklený povrch prietokového článku vyčistite alkoholovou utierkou bez vlákien. Sklo osušte laboratórnou tkaninou bez vlákien.
 - ▶ Presvedčte sa, či je sklený povrch prietokového článku čistý. V prípade potreby čistenie zopakujte.
 - ▶ Vyberte použitý prietokový článok z predchádzajúceho chodu.
 - ▶ Prietokový článok zarovnajte nad zarovnávacie kolíky a umiestnite ho na plošinu.
- 5 Vyberte možnosť **Load** (Zasunúť).
Dvierka sa automaticky zatvoria, na obrazovke sa zobrazí ID prietokového článku a skontrolujú sa snímače.
- 6 Podľa pokynov softvéru vyprázdniť zásobník na zber použitých reagensí, zasuňte kazetu s pufrom NextSeq 550Dx a kazetu s reagensiami NextSeq 550Dx.
Po zasunutí kaziet s pufrom a reagensiami NextSeq 550Dx softvér prečíta a zaznamená RFID. Na obrazovke sa zobrazia ID kazety s pufrom a reagensiami a skontrolujú sa snímače.
- 7 Po dokončení kontroly pred spustením chodu vyberte možnosť **Start** (Spustiť). (Tento krok nie je potrebný, ak je systém nakonfigurovaný na automatické spustenie.)
- 8 Keď sa začne chod, zobrazí sa obrazovka Sequencing (Sekvenovanie). Táto obrazovka poskytuje vizuálne znázornenie prebiehajúceho chodu, intenzít a skóre kvality (skóre Q).

Výsledky

Softvér na analýzu v reálnom čase (Real-Time Analysis, RTA) je integrovaný softvér, ktorý vykoná analýzu snímok a primárnu analýzu báz a každej báze priradí za každý sekvenovací cyklus skóre kvality. Po dokončení primárnej analýzy vybraný modul softvéru Local Run Manager automaticky začne na prístroji NextSeq 550Dx sekundárnu analýzu. Procesy, ktoré sú tu opísané, sa vzťahujú na moduly na analýzu germinálnych a somatických variantov.

Demultiplexovanie

Demultiplexovaním sa porovnáva každá sekvencia čítania indexu so sekvenciami indexu špecifikovanými pre chod. V tomto kroku sa nezohľadňujú žiadne hodnoty kvality.

Čítania indexu sa identifikujú pomocou týchto krokov:

- ▶ Vzorky sa očísľujú od 1 podľa ich poradia uvedeného v chode.
- ▶ Číslo vzorky 0 sa ponecháva pre klastre, ktoré neboli priradené k žiadnej vzorke.
- ▶ Klastre sa priradia ku vzorke vtedy, keď sa sekvencia indexu presne zhoduje alebo keď sa v indexe čítania vyskytuje maximálne jedna nezhoda.

Generovanie súborov FASTQ

Po demultiplexovaní softvér generuje dočasné analytické súbory vo formáte FASTQ, čo je textový formát používaný na znázornenie sekvencií. Súbory FASTQ obsahujú čítania každej vzorky a súvisiace skóre kvality. Klastre, ktoré nespĺnia podmienky filtrov, sa vylúčia.

Každý súbor FASTQ obsahuje čítanie len jednej vzorky a názov tejto vzorky je zahrnutý v názve súboru FASTQ. V moduloch na analýzu germinálnych a somatických variantov sa na vzorku a oligo skupinu generuje osem súborov FASTQ, štyri z čítania 1 a štyri z čítania 2. Tieto výstupné výsledky vyústia do celkovo 8 a 16 súborov FASTQ na vzorku pre modul na analýzu germinálnych a somatických variantov. Súbory FASTQ sú primárnym vstupom na zarovnanie.

Zarovnanie

Počas kroku zarovnania zarovnáva Smith-Watermanov zväzkový algoritmus klastre z každej vzorky so sekvenciami amplikónov uvedenými v súbore manifestov.

Smith-Watermanov zväzkový algoritmus vykonáva semiglobálne zarovnania sekvencií s cieľom určiť podobné oblasti medzi dvoma sekvenciami. Namiesto porovnávania celej sekvencie Smith-Watermanov algoritmus porovnáva segmenty všetkých možných dĺžok.

Každé čítanie z oboch koncov sa vyhodnotí z hľadiska zarovnania s príslušnými sondovacím sekvenciami tohto čítania.

- ▶ Čítanie 1 sa hodnotí voči reverznému komplementu nižšie položených lokusových oligonukleotidov (Downstream Locus-Specific Oligos, DLSO).
- ▶ Čítanie 2 sa hodnotí voči reverznému komplementu vyššie položených lokusových oligonukleotidov (Upstream Locus-Specific Oligos, ULSO).
- ▶ Ak sa začiatok čítania zhoduje so sondovacou sekvenciou s najviac jednou nezhodou, celá dĺžka čítania sa zarovná s cieľovým amplikónom tejto sekvencie.
- ▶ Ak sa začiatok čítania zhoduje so sondovacou sekvenciou s najviac tromi rozdielmi (nezhody alebo posuny spôsobené začiatočnými indelmi), celá dĺžka čítania sa zarovná s cieľovým amplikónom tejto sekvencie.
- ▶ Indely v rámci DLSO a ULSO sa vzhľadom na chemické postupy rozboru nepozorovali.

Na základe frekvencie rozdielov buď v oblasti záujmu, alebo v celom amplikóne, a to v závislosti od dĺžky amplikónu, sa z výsledkov zarovnania filtrujú zarovnania. Filtrované zarovnania sa zapisujú do súborov zarovnania ako nezarovnané a pri primárnej analýze variantov sa nepoužijú.

Primárna analýza variantov

Úlohou programu na primárnu analýzu variantov Pisces je pripraviť pre prístroj SNV a primárne analýzy indelových variantov.

Správy a ďalšie výstupné súbory

Moduly na analýzu variantov vytvárajú správy vo formáte PDF a správy oddelené tabuľkami (*.txt), ktoré zobrazujú metriku, ako je sekvenčná hĺbka a počty variantov. Moduly vytvárajú aj výstupné súbory, napr. súbory VCF a gVCF (genome Variant Call Format) pre aplikácie na primárnu analýzu variantov.

Postupy kontroly kvality

Softvér NextSeq 550Dx zohľadňuje pri vyhodnocovaní každého chodu, každej vzorky a primárnej analýzy báz metriku kontroly kvality. Pri príprave knižníc sa odporúčajú pozitívne aj negatívne kontroly, a je potrebné ich vyhodnotiť. Kontroly vyhodnocujte takto:

- **Negatívna kontrola (žiadna kontrola templátu) alebo iná negatívna kontrola** – Musí generovať očakávaný výsledok. Ak negatívna kontrola generuje výsledok, ktorý sa neočakáva, mohla sa vyskytnúť chyba pri sledovaní vzoriek, nesprávny zápis indexovacích primérov alebo kontaminácia.
- **Pozitívna kontrolná vzorka** – Musí generovať očakávaný výsledok. Ak pozitívna kontrola generuje výsledok, ktorý sa neočakáva, mohla sa vyskytnúť chyba pri sledovaní vzoriek alebo nesprávny zápis indexovacích primérov.

Výkonnostné charakteristiky

Výkonnostné charakteristiky prístroja NextSeq 550Dx sa stanovili modulom na analýzu germinálnych variantov a modulom na analýzu somatických variantov pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a potvrdili sa pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Štúdie zahŕňali indexovanie vzoriek, prenos vzoriek, vstup DNA, analytickú citlivosť (medza blanku/medza detekcie), správnosť, presnosť, porovnanie metód a reprodukovateľnosť.

Analytické štúdie vykonané pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) boli určené na vyhodnotenie výkonnostných požiadaviek predtým stanovených pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Výsledky demonštrujú, že súpravy reagensí (v2 a v2.5) majú pri použití súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx porovnateľnú výkonnosť. Výkonnostné charakteristiky súvisiace s predanalytickými faktormi, ako sú napríklad metódy extrakcie alebo interferujúce látky, nájdete v *príbalovom letáku súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Definície výpočtov použitých pri výkonových charakteristikách

1. Percento pozitívnej zhody (Positive Percent Agreement, PPA) sa vypočíta ako pomer lokusov, ktoré sa referenčnou metódou klasifikujú ako varianty a ktoré rozbor správne vykáže.
 - ▶ $(\text{počet lokusov variantu správne vykázaných rozborom}) / (\text{celkový počet lokusov variantu})$
Lokusy variantu vykázané rozborom, ktoré sú v súlade s referenčnou metódou, sú skutočne pozitívne (True Positive, TP). Lokusy variantu vykázané rozborom ako referenčné primárne analýzy alebo iné primárne analýzy variantu sú falošne negatívne (False Negative, FN).
2. Percento negatívnej zhody (Negative Percent Agreement, NPA) sa vypočíta ako pomer lokusov, ktoré sa referenčnou metódou klasifikujú ako lokusy divokého typu a ktoré rozbor správne vykáže.
 - ▶ $(\text{počet lokusov divokého typu správne vykázaných rozborom}) / (\text{celkový počet lokusov divokého typu})$
Lokusy divokého typu vykázané rozborom, ktoré sú v súlade s referenčnou metódou, sú skutočne negatívne (True Negative, TN). Lokusy divokého typu vykázané rozborom ako varianty sú falošne pozitívne (False Positive, FP).

- 3 Percento celkovej zhody (Overall Percent Agreement, OPA) sa vypočíta ako pomer lokusov správne vykázaných rozborom vzhľadom na referenčnú metódu.
 - ▶ $((\text{počet lokusov divokého typu správne vykázaných rozborom}) + (\text{počet lokusov divokého typu správne vykázaných rozborom})) / ((\text{celkový počet lokusov variantu}) + (\text{celkový počet lokusov divokého typu}))$
- 4 Výpočty PPA, NPA a OPA nezahŕňajú žiadne primárne analýzy (variant alebo referenčný lokus nespĺňajú jeden alebo viacero filtrov kvality).
- 5 Miera autozomálnej primárnej analýzy sa vypočíta ako celkový počet lokusov spĺňajúcich podmienky filtrov delené celkovým počtom pozícií sekvenovaných pre chromozómy 1 – 22; chromozómy X a Y sú vylúčené. Táto metrika nezohľadňuje zhodu primárnych analýz s referenčnou metódou.

Výkonnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov)

Indexovanie vzoriek

Indexovacie priméry vzoriek pridané pri príprave knižníc priradia každej vzorke DNA unikátnu sekvenciu. Tieto unikátne sekvencie umožňujú zlúčiť viac vzoriek do jedného sekvenovacieho chodu. Indexovanie vzoriek sa používa pri germinálnych aj somatických pracovných postupoch. Účelom tejto štúdie bolo stanoviť minimálny (8) a maximálny (96) počet vzoriek, ktorý môže prístroj NextSeq 550Dx spracovať v rámci jedného sekvenovacieho chodu. Testovalo sa osem unikátnych vzoriek Platinum Genome s 12 rôznymi kombináciami indexovacích primérov na vzorku. Výsledky štyroch sekvenovacích chodov získané modulom na analýzu germinálnych variantov sa porovnali s Platinum Genomes vo verzii 2016-1.0.

Pri prvej skupine chodov sa knižnice s 96 unikátnymi indexovanými vzorkami testovali reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadávanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz na reťazec na všetkých 23 ľudských chromozómoch s cieľom overiť schopnosť rozboru vykonať dôslednú genotypizačnú primárnu analýzu v rámci rôznych kombinácií indexovacích primérov. Pri druhej skupine chodov sa knižnice s ôsmimi unikátnymi indexovanými vzorkami sekvenovali v dvoch sekvenovacích chodoch, aby sa overil minimálny počet podporovaných indexov.

Pri chodoch s 96 indexmi sa PPA pre jednonukleotidové varianty pohybovala v rozsahu 98,7 % až 100 %, PPA pre inzercie a delécie predstavovala 100 % a NPA bola 100 % pre každú z 96 kombinácií indexov. Hodnoty PPA chodov s 8 indexmi boli na úrovni 100 % (jednonukleotidové varianty, inzercie a delécie) a NPA na úrovni 100 % pre každú z ôsmich kombinácií indexov.

Prenos vzoriek

Prístroj NextSeq 550Dx umožňuje v jednom sekvenovacom chode sekvenovanie viacerých vzoriek a viac kontrol. Bola vykonaná štúdia s cieľom vyhodnotiť rozsah prenosu vzoriek v rámci jedného sekvenovacieho chodu (v rámci chodu) a medzi sekvenovacími chodmi (od chodu k chodu). Reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadávanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz (150 amplikónov) na 23 rôznych chromozómoch vrátane oboch pohlavných chromozómov sa testovali dve vzorky Platinum Genome, jedna mužská a jedna ženská. Knižnice sa sekvenovali na prístroji NextSeq 550Dx pomocou modulu na analýzu germinálnych variantov. Pozoroval sa prenos mužských vzoriek do ženských podľa prítomnosti čítania amplikónu chromozómu Y v ženských vzorkách.

Prenos v rámci chodu sa môže zaviesť počas generovania klastrov, primárnej analýzy báz indexového cyklu a demultiplexovania vzoriek. Na účely testovania prenosu vzoriek v rámci sekvenovacieho chodu sa skupina knižnice skladajúca sa zo 46 replikátov mužských aj ženských vzoriek a štyroch kontrol bez templátu raz sekvenovala na prístroji NextSeq 550Dx. Prenos vzoriek v rámci chodu sa posúdil porovnaním pokrytia každého ženského replikátu amplikónu z chromozómu Y a priemerného pokrytia všetkých mužských replikátov v skupine amplikónov na chromozóme Y. Medián pozorovaný pri prenose v rámci chodu predstavoval 0,084 %.

Na účely testovania prenosu vzoriek medzi chodmi sa pripravili dve skupiny knižníc, ktoré sa postupne sekvenovali na prístroji NextSeq 550Dx. Prvá skupina obsahovala 46 replikátov ženskej vzorky plus dve kontroly bez templátu. Druhá skupina obsahovala 46 replikátov mužskej vzorky plus dve kontroly bez templátu. Pri oboch skupinách sa využil rovnaký súbor indexových adaptérov. Najprv sa sekvenovala ženská skupina, následne sa sekvenovala mužská skupina a nasledoval ďalší chod sekvenovania ženskej

skupiny. Prenos vzoriek medzi chodmi sa posúdil porovnaním prekrytia zodpovedajúcich replikátov opakovaného chodu ženskej skupiny a chodu mužskej skupiny amplicónu z chromozómu Y. Medián pozorovaný pri prenose v rámci chodu predstavoval 0,0076 %.

Vstup DNA

Krv (germinálny)

Na prípravu knižnice na prístroji NextSeq 550Dx s využitím pracovného postupu modulu na analýzu germinálnych variantov sa stanovil rozsah vstupu DNA krvi. Tento rozsah sa vyhodnotil vykonaním štúdie sériového riedenia pomocou 13 vzoriek Platinum Genome a reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz na 23 rôznych chromozómoch. Knižnica sa sekvenovala na dvoch prístrojoch NextSeq 550Dx pomocou jednej šarže súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Päť vzoriek sa testovalo duplicitne na piatich úrovniach DNA v rozsahu od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 12 ng). Osem vzoriek sa testovalo ako jediný replikát na každej z piatich úrovni vstupu DNA. Na určenie správnosti sa vzorové genotypy porovnali s Platinum Genomes vo verzii 2016-1.0. Výsledky sa stanovili pre každú úroveň vstupu. PPA pre každý typ variantu (jednonukleotidové varianty, inzercie a delécie) znázorňuje [Tabuľka 1](#); NPA znázorňuje [Tabuľka 2](#). Všetky úrovne vstupu boli podobne správne. Odporúčaný vstup pre súpravu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng, pričom 25 ng a 100 ng predstavujú dolnú a hornú hranicu na splnenie výkonnostných charakteristík.

Tabuľka 1 Výsledky PPA pre každý vstup DNA podľa typu variantu

Vstup DNA (ng)	Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	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	Inzercia	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	Delécia	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

Tabuľka 2 NPA pre každý vstup DNA

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Referencia so žiadnymi primárnymi analýzami	NPA (%)
12	430940	4	26	> 99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	> 99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (somatický)

Pre prístroj NextSeq 550Dx sa na prípravu knižnice s využitím pracovného postupu modulu na analýzu somatických variantov stanovil rozsah vstupu DNA fixovaných formalínom a zaliatých do parafínu (FFPE) pre súpravu TruSeq Custom Amplicon Kit. Rozsah vstupov DNA sa vyhodnotil vykonaním štúdie sériového riedenia pomocou troch vzoriek Platinum Genome a reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz na 23 rôznych chromozómoch. Bunkové línie Platinum Genome GM12878 a GM12877 sa zafixovali formalínom, zaliati sa do parafínu a nasledovala extrakcia DNA. Bunková línia GM12878 sa zriedila líniou GM12877 tak, že frekvencie variantných alel 81 variantov (55 jednonukleotidových variantov, 10 inzercí a 16 delécií) sa pohybovali v blízkosti hodnôt 0,025, 0,05 alebo 0,10. Okrem toho každá vzorka mala 91 variantov s vyššími frekvenciami variantov až do VAF 1,0. Vzorky sa spracovali duplicitne na piatich úrovniach vstupu DNA s priemerným delta kvantitatívnym cyklom (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 a 7,8 meraným súpravou TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Každá knižnica sa sekvenovala na dvoch prístrojoch NextSeq 550Dx pomocou dvoch šarží súprav reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Na stanovenie presnosti sa primárne analýzy variantov vzoriek porovnali s Platinum Genomes vo verzii 2016-1.0. PPA každého typu variantu (jednonukleotidové varianty, inzercie a delécie) znázorňuje [Tabuľka 3](#); NPA znázorňuje [Tabuľka 4](#). Odporúčaný vstup DNA pre varianty na úrovni VAF 0,05 alebo vyššej je $dCq \leq 4$, pričom na splnenie výkonnostných charakteristík je hodnota 4,6 dolným limitom.

Tabuľka 3 Výsledky PPA pre každý vstup DNA podľa typu variantu

Priemerný dCq	Typ variantu	Očakávané varianty	Očakávané žiadne	Cieľové riedenie VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	PPA (%)	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	PPA (%)	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nie je k dispozícii.	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	Inzercia	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	Delécia	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

Tabuľka 4 NPA pre každý vstup DNA

Priemerný dCq	Očakávaný divokého typu	Cieľové riedenie VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referencia so žiadnymi primárnymi analýzami	NPA	Referencia so žiadnymi primárnymi analýzami	NPA (%)	Referencia so žiadnymi primárnymi analýzami	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

Analytická citlivosť (medza blanku [LoB] a medza detekcie [LoD])

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť na prístroji NextSeq 550Dx medzu blanku (LoB) a medzu detekcie (LoD) modulu na analýzu somatických variantov. Vykonalo sa to pomocou reprezentatívneho rozboru určeného na vyhľadanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz na 23 rôznych chromozómoch. Bunkové línie Platinum Genome GM12878 a GM12877 sa zafixovali formalínom, zaliali sa do parafínu a nasledovala extrakcia DNA. Bunková línia GM12878 sa zriedila líniou GM12877 tak, že frekvencia 74 variantov (53 jednonukleotidových variantov, 7 inzercí a 14 delécií) bola $0,05 \pm 0,02$. Bunková línia GM12877 a zriedená bunková línia GM12878 (GM12878-D) sa testovali šesť po sebe nasledujúcich počiatočných dní, pričom sa striedali dve šarže súprav reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) na dosiahnutie celkovo šiestich sekvenovacích chodov. Výsledkom tohto testu bolo 60 replikátov každého variantu v GM12878-D a 72 replikátov každej zodpovedajúcej súradnice divokého typu v GM12877 pri každej šarži reagencií. LoB a LoD sa vypočítali klasickou metódou pomocou neparametrickej možnosti uvedenej v CLSI EP17-A2. LoB a LoD sa vypočítali samostatne pre jednonukleotidové varianty (SNV), inzercie a delécie zlúčením frekvencií variantov daného typu variantu. Chyba typu I bola definovaná ako 0,01 a chyba typu II ako 0,05.

V prípade LoB sa frekvencie združených variantov zoradili od najnižšej po najvyššiu a pre každý typ variantu sa vypočítala 99. pozícia každej šarže reagencií (Tabuľka 5). Modul na analýzu somatických variantov využíva na stanovenie kvalitatívnej detekcie variantov medznú hodnotu (účinnú LoB) VAF 0,026. Vypočítanou LoB sa overilo, že táto medzná hodnota nemá za následok chybu typu I väčšiu ako 0,01.

Tabuľka 5 Medza blanku

Typ variantu	Celkový počet pozorovaní	Šarža reagencií 1 pre LoB (%)	Šarža reagencií 2 pre LoB (%)
SN	3816	0,77	0,77
Inzercia	504	0,56	0,56
Delécia	1008	1,20	1,20

V prípade LoD sa vypočítalo percento frekvencií jednotlivých mutácií pre každú šaržu reagencií a každý typ variantu pod medznou hodnotou 0,026 (Tabuľka 6). Vzhľadom na to, že percentuálne hodnoty boli nižšie ako 5 % chyba typu II (0,05), ako LoD sa vypočítal medián kombinovaných frekvencií variantov (Tabuľka 6). Za LoD každého typu variantov sa považovala väčšia z dvoch hodnôt vypočítaná pre dve šarže reagencií – 4,97 % pre jednonukleotidové varianty (SNV), 5,12 % pre inzercie a 5,26 % pre delécie.

Tabuľka 6 Medza detekcie

Šarža reagensií	Typ variantu	Celkový počet pozorovaní	Počet meraní VAF < 2,6 %	Počet meraní VAF < 2,6 %	Medza detekcie (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Inzercia	420	6	1,4	5,08
	Delécia	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Inzercia	420	5	1,2	5,12
	Delécia	840	7	0,80	5,26

Správnosť

Germinálny

Na vyhodnotenie správnosti primárnej analýzy modulu na analýzu germinálnych variantov na prístroji NextSeq 550Dx sa pomocou súpravy reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) vykonala táto štúdia. Reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadávanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz (150 amplikónov) na 23 rôznych chromozómoch sa testovalo 13 unikátnych vzoriek Platinum Genome. Počas piatich počiatkových dní vykonali traja operátori na troch sekvenovacích prístrojoch s tromi šaržami reagensií spolu deväť chodov. Porovnaním výsledkov s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou, Platinum Genomes vo verzii 2016- 1.0, sa stanovila správnosť jednonukleotidových variantov, inzercií a delécií. Pokiaľ nie je uvedené inak, na základe tejto metódy sa definovali spoľahlivé genomické oblasti.

Tabuľka 7 Súhm germinálnej zhody

Kritériá	Celkový počet pozorovaní ¹	Výsledok podľa pozorovania ²	Výsledok podľa chodu ³
PPA pre SNV	819	98,7	> 99,9
PPA pre inzercie	819	95,0	98,9
PPA pre delécie	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Vypočítané ako počet vzoriek na chod (91) x počet chodov (9) = 819.

²Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzoriek v rámci všetkých 9 chodov.

³Najnižšia hodnota pri súhrnnej analýze údajov z každého chodu.

Tabuľka 8 obsahuje údaje zo štúdie prezentované s percentom pozitívnej a negatívnej zhody podľa vzoriek, kde sa na výpočet PPA porovnávajú výsledky variantov s Platinum Genomes vo verzii 2016-1.0. Kombinujú sa tri typy variantov (SNV, inzercie a delécie). Vzhľadom na to, že referenčná metóda poskytuje výsledky len jednonukleotidových variantov a inzercií/delécií, na výpočet NPA sa výsledky nevariantných báz porovnávajú s referenčnou sekvenciou ľudského genómu hg19.

Tabuľka 8 Germinálna zhoda na vzorku

Vzorka	Priemerná miera primárnej analýzy	Očakávané varianty ¹	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	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

Vzorka	Priemerná miera primárnej analýzy	Očakávané varianty ¹	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	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

¹ Celkový počet variantov vo všetkých replikátoch vzoriek v rámci 9 chodov.

Tabuľka 9 obsahuje údaje zo štúdie prezentované podľa vzoriek, kde sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou. Detekcia sa vyhodnocuje pre každý typ variantu – jednonukleotidové varianty, inzercie a delécie – samostatne. Referenčné pozície sú vylúčené.

Tabuľka 9 Germinálna zhoda na vzorku podľa typu variantu

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

Pri vzorkách sa ďalej analyzovali primárne analýzy malých inzercií a delécií (indely). Celkový súhrn znázorňuje Tabuľka 10. Celkový počet indelov bol 71 s dĺžkou v rozsahu 1 – 24 bp pri inzerciách a 1 – 25 bp pri deléciách.

Tabuľka 10 Súhrn germinálnej detekcie indelov

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	PPA
Inzercia	18522	18018	27	477	99,9
Delécia	17388	17073	0	315	100

Na pokrytie rôzneho genomického obsahu bol určený reprezentatívny rozbor, ktorý sa skladal zo 150 amplicónov. Obsah GC amplicónov sa pohyboval v rozmedzí 0,19 – 0,87. V amplicónoch sa tiež opakoval jeden nukleotid (napr. poly A, poly T), dinukleotid a trinukleotid. Aby sa stanovil účinok genomického obsahu na percento správnych primárnych analýz, údaje sa zostavili podľa amplicónov (Tabuľka 11). Percento správnych primárnych analýz sa skladá z primárnych analýz variantov a referencií a ak sa vyskytnú nesprávne primárne analýzy alebo sa nevyskytnú žiadne, je nižšie ako 100 %.

Tabuľka 11 Správnosť na úrovni germinálneho amplicónu

Amplicón	Chromozóm	Začiatok amplicónu	Koniec amplicónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah génomu amplicónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
42	6	112435865	112435955	91	91	poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22August 202	76 22202148 73		73	nie je k dispozícii	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	nie je k dispozícii	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	nie je k dispozícii	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,52	59787	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	poly A (5), 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	nie je k dispozícii	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	nie je k dispozícii	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	nie je k dispozícii	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	nie je k dispozícii	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	nie je k dispozícii	0,61	76986	0	0	100

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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
146	X	135288543	135288611	69	69	poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	nie je k dispozícii	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	nie je k dispozícii	0,55	0	0	0	nie je k dispozícii

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
149	Y	2655519	2655609	91	0	nie je k dispozícii	0,48	0	0	0	nie je k dispozícii
150	Y	2655609	2655679	71	0	poly A (5)	0,37	0	0	0	nie je k dispozícii

Výsledky sekvenovania vzorky NA12878 sa porovnali s vysoko spoľahlivým genotypom NA12878, ktorý stanovil Národný inštitút pre normy a technológie (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Zo 150 amplikónov bolo v sekvencii NIST 92 amplikónov plne obsiahnutých vo veľmi spoľahlivých genomických oblastiach, 41 amplikónov malo čiastočné prekrytie a 17 amplikónov nemalo žiadne prekrytie. Na porovnanie tento výsledok vyústil do 10 000 súradníc na replikát. Nevariantné primárne analýzy báz sa porovnali s referenčnou sekvenciou ľudského genómu hg19. Výsledky presnosti znázorňuje [Tabuľka 12](#).

Tabuľka 12 Germinálna zhoda vzorky NA12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet amplikónov	Priemerná miera primárnej analýzy	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Na základe údajov získaných touto deväťchodovou germinálnou štúdiou dokáže prístroj NextSeq 550Dx konzistentne sekvenovať:

- ▶ obsah GC \geq 19 % (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch so správne primárne analyzovaným 19 % obsahom GC s 0,6 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ obsah GC \leq 87 % (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch so správne primárne analyzovaným 87 % obsahom GC s nulovou mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly A \leq 9 (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly A deviatich správne primárne analyzovaných nukleotidov s nulovou mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly T \leq 10 (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly T desiatich správne primárne analyzovaných nukleotidov s nulovou mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly G \leq 7 (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly G siedmich správne primárne analyzovaných nukleotidov s 1,0 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly C \leq 6 (všetky primárne analyzované bázy v 2457 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly C šiestich nukleotidov boli správne primárne analyzované s nulovou mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky opakovania dinukleotidov \leq 11x (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie 11x dinukleotidov boli správne primárne analyzované s 0,5 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky opakovania trinukleotidov \leq 5x (všetky primárne analyzované bázy v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie 5x trinukleotidov boli správne primárne analyzované s 0,5 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky inercie \leq 24 (66 343 zo 66 370 primárne analyzovaných báz v 819 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich správne primárne analyzovanú 24-nukleotidovú inerciu s 1,2 % mierou žiadnej primárnej analýzy; v oblasti obsahujúcej 24-nukleotidovú inerciu sa nevyskytli žiadne nesprávne primárne analýzy)
- ▶ dĺžky delécie \leq 25 (všetky primárne analyzované bázy v 2457 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich správne primárne analyzovanú 25-nukleotidovú deléciu s nulovou mierou žiadnej primárnej analýzy)

Somatický

Na posúdenie správnosti primárnej analýzy variantov modulu na analýzu somatických variantov na prístroji NextSeq 550Dx s použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sa použila tu opísaná štúdia.

V tejto štúdii sa použil reprezentatívny rozbor určený na vyhľadanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz (150 amplikónov) na 23 rôznych chromozómoch. Z ošetrovaných blokov FFPE sa izoloval Platinum Genome DNA, ktorý vygeneroval šesť unikátnych vzoriek na vyhodnotenie v štúdii.

Vzorka DNA GM12877 sa zriedila vzorkou DNA GM12878, čím sa vytvorila skupina unikátnych heterozygotných variantov, GM12877-D5 a GM12877-D7, s frekvenciami variantov takmer 5 % a 7 %. Podobne sa vzorka DNA GM12878 zriedila vzorkou DNA GM12877, čím sa vytvorili GM12878-D5 a GM12878-D7. Každá vzorka sa testovala trojnásobne okrem zriedených vzoriek, ktoré sa testovali v šiestich opakovaniach. Počas piatich počiatkových dní vykonali traja operátori na troch sekvenovacích prístrojoch s tromi šaržami reagentov spolu deväť chodov. Porovnaním výsledkov s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou, Platinum Genomes vo verzii 2016- 1.0, sa stanovila správnosť SNV, inzercíí a delécií. Pokiaľ nie je uvedené inak, na základe tejto metódy sa definovali spoľahlivé genomické oblasti.

Tabuľka 13 Súhm somatickej zhody

Kritériá	Celkový počet pozorovaní ¹	Výsledok podľa pozorovania ²	Výsledok podľa chodu ³
PPA pre SNV	378	98,9	99,9
PPA pre inzercie	378	96,9	99,9
PPA pre delécie	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Vypočítané ako počet vzoriek na chod (42) x počet chodov (9) = 378.

²Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzoriek v rámci všetkých 9 chodov.

³Najnižšia hodnota pri súhrnnej analýze údajov z každého chodu.

Tabuľka 14 obsahuje údaje zo štúdie prezentované s percentom pozitívnej a negatívnej zhody podľa vzoriek, kde sa na výpočet PPA porovnávajú výsledky variantov s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou. Kombinujú sa tri typy variantov (SNV, inzercie a delécie). Vzhľadom na to, že referenčná metóda poskytuje výsledky len jednonukleotidových variantov a inzercíí/delécií, na výpočet NPA sa výsledky nevariantných báz porovnávajú s referenčnou sekvenciou ľudského genómu hg19.

Tabuľka 14 Somatická zhoda na vzorku

Vzorka	Priemerná miera primárnej analýzy	Očakávaná hodnota	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	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

Tabuľka 15 obsahuje údaje zo štúdie prezentované podľa vzoriek, kde sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou. Detekcia sa vyhodnocuje pre každý typ variantu – jednonukleotidové varianty, inzercie a delécie – samostatne. Referenčné pozície sú vylúčené.

Tabuľka 15 Somatická zhoda na vzorku podľa typu variantu

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

Pri desiatich vzorkách sa ďalej analyzovali primárne analýzy malých inzercí a delécií (indelov) (Tabuľka 16). Celkový počet indelov bol 71 s dĺžkou v rozsahu 1 – 24 bp pri inzerciách a 1 – 25 bp pri deléciách.

Tabuľka 16 Súhm somatickej detekcie indelov

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Variant so žiadnymi primárnymi analýzami	PPA
Inzercia	10773	10282	9	482	99,2
Delécia	11502	10667	5	830	>99,9

Na pokrytie rôzneho genomického obsahu bolo určených 150 amplikónov. Obsah GC amplikónov sa pohyboval v rozmedzí 0,19 – 0,87 %. V amplikónoch sa tiež opakoval jeden nukleotid (napr. poly A, poly T), dinukleotid a trinukleotid. Aby sa stanovil účinok genomického obsahu na percento správnych primárnych analýz, údaje sa zostavili podľa amplikónov (Tabuľka 17). Percento správnych primárnych analýz sa skladá z primárnych analýz variantov a referencií a ak sa vyskytnú nesprávne primárne analýzy alebo sa nevyskytnú žiadne, je nižšie ako 100 %.

Tabuľka 17 Správnosť na úrovni somatického amplikónu

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
18	3	46620561	46620643	83	83	nie je k dispozícii	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	22August 202	76 22202148 73		73	nie je k dispozícii	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
56	9	107620823	107620918	96	96	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	nie je k dispozícii	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	nie je k dispozícii	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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
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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	nie je k dispozícii	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	poly A (6), TG (3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	nie je k dispozícii	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	nie je k dispozícii	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	nie je k dispozícii	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	nie je k dispozícii	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	nie je k dispozícii	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

Amplikón	Chromozóm	Začiatok amplikónu	Koniec amplikónu	Veľkosť analyzovaného fragmentu	Bázy v spoľahlivých oblastiach	Obsah genómu amplikónu	Obsah GC	Správne primárne analýzy	Nesprávne primárne analýzy	Žiadne primárne analýzy	% správnych primárnych analýz
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	nie je k dispozícii	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	nie je k dispozícii	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	nie je k dispozícii	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	nie je k dispozícii	0,55	0	0	0	nie je k dispozícii
149	Y	2655519	2655609	91	0	nie je k dispozícii	0,48	0	0	0	nie je k dispozícii
150	Y	2655609	2655679	71	0	poly A (5)	0,37	0	0	0	nie je k dispozícii

Výsledky sekvenovania vzorky GM12878 sa porovnali s vysoko spoľahlivým genotypom NA12878, ktorý stanovil Národný inštitút pre normy a technológie (National Institutes of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Zo 150 amplikónov bolo v sekvencii NIST 92 amplikónov plne obsiahnutých vo veľmi spoľahlivých genomických oblastiach, 41 amplikónov malo čiastočné prekrytie a 17 amplikónov nemalo žiadne prekrytie. Na porovnanie tento výsledok vyústil do 10 000 súradníc na replikát. Nevariantné primárne analýzy báz sa porovnali s referenčnou sekvenciou ľudského genómu hg19. Výsledky presnosti znázorňuje [Tabuľka 18](#).

Tabuľka 18 Somatická zhoda vzorky GM12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet amplikónov	Priemerná miera primárnej analýzy	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Na základe údajov získaných touto deväťchodovou somatickou štúdiou dokáže prístroj NextSeq 550Dx konzistentne sekvenovať:

- ▶ obsah GC \geq 19 % (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch so správne primárne analyzovaným 19 % obsahom GC s 2,6 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ obsah GC \leq 87 % (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch so správne primárne analyzovaným 87 % obsahom GC s 0,6 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly A \leq 9 (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly A deviatich správne primárne analyzovaných nukleotidov s 2,5 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly T \leq 10 (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly T desiatich správne primárne analyzovaných nukleotidov s 0,1 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly G \leq 6 (všetky primárne analyzované bázy v 2268 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly G šiestich správne primárne analyzovaných nukleotidov s 0,5 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky poly C \leq 6 (všetky primárne analyzované bázy v 756 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie poly C šiestich správne primárne analyzovaných nukleotidov s 0,4 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky opakovania dinukleotidov \leq 4x (všetky primárne analyzované bázy v 1890 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie 4x dinukleotidov boli správne primárne analyzované s 0,9 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky opakovania trinukleotidov \leq 5x (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich opakovanie 5x trinukleotidov boli správne primárne analyzované s 1,4 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky inzercie \leq 23 (všetky primárne analyzované bázy v 378 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich správne primárne analyzovanú 23-nukleotidovú inzerciu s 0,8 % mierou žiadnej primárnej analýzy)
- ▶ dĺžky delécie \leq 25 (všetky primárne analyzované bázy v 1134 sekvenovaných amplikónoch obsahujúcich správne primárne analyzovanú 25-nukleotidovú deléciu s 0,7 % mierou žiadnej primárnej analýzy)

Presnosť

Presnosť prístroja NextSeq 550Dx sa stanovila testovaním 13 jedinečných vzoriek Platinum Genome. V priebehu piatich počiatkových dní sa za účasti troch operátorov na troch prístrojoch a pomocou troch šarží reagensí vygenerovalo deväť sekvenovacích chodov. Reprezentatívny rozbor, vzorky a referenčná metóda sú rovnaké ako pri štúdiu germinálnej presnosti. Podiely presnosti sa stanovili analýzou rozptylu komponentov pomocou frekvencie variantných alel (VAF) ako stavovej premennej a výpočtom štandardných odchýlok na úrovni komponentu prístroja, šarže reagensí, operátora a dňa začatia ([Tabuľka 19](#)). Pri analýze každého komponentu prístroja, operátora alebo variability šarží reagensí sa použilo celkovo 699 pozorovaní jednonukleotidových variantov (SNV), 176 pozorovaní inzercií a 235 pozorovaní delécií.

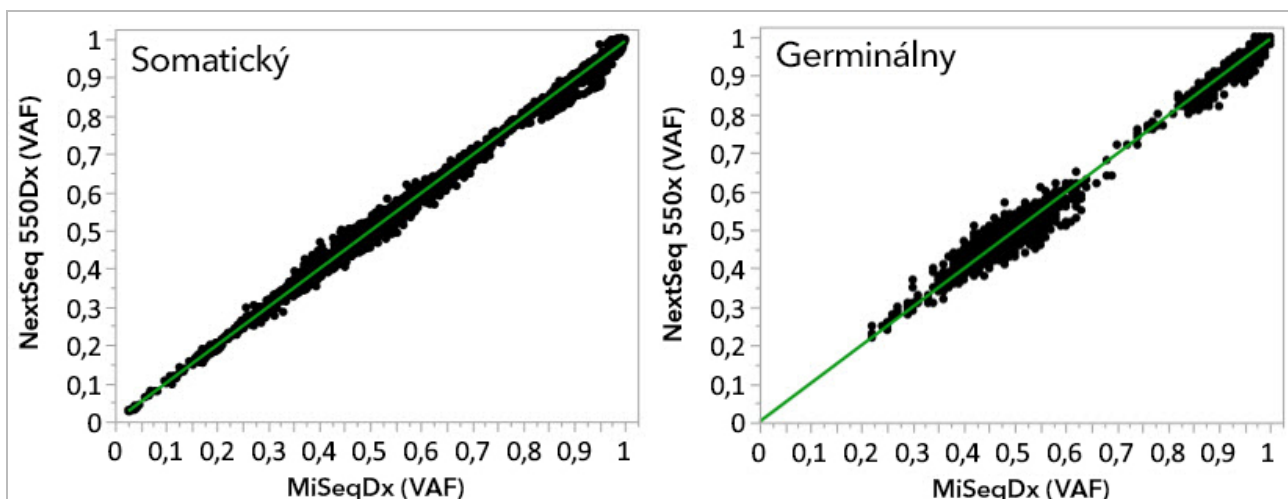
Tabuľka 19 Výsledky presnosti prístroja NextSeq 550Dx (štandardná odchýlka)

Komponent	Typ variantu	SD komponentu		Celková SD	
		Max.	Medián	Max.	Medián
Šarža	SN	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inzercia	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delécia	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Prístroj	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inzercia	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delécia	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operátor	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inzercia	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delécia	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Deň	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inzercia	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delécia	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Porovnanie metód (sekvenčná platforma)

Na prístrojoch NextSeq 550Dx a MiSeqDx sa pomocou germinálnych a somatických pracovných postupov súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx posudzovala plná krv a vzorky FFPE. Zhoda frekvencie variantov krvi a vzoriek FFPE sa vyhodnotila niekoľkými reprezentatívnymi rozborami. Obrázok 2 znázorňuje koreláciu VAF medzi dvoma prístrojmi pre jeden reprezentatívny rozbor a Tabuľka 20 znázorňuje súhrn tejto korelácie podľa rozborového panela. Na základe silnej korelácie medzi prístrojom MiSeqDx a prístrojom NextSeq 550Dx sa zistilo, že výkonnostné charakteristiky súvisiace s predanalytickými faktormi (napr. metódy extrakcie alebo interferujúce látky) sa môžu uplatniť pri oboch prístrojoch. Ďalšie podrobnosti nájdete v príbalovom letáku súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Obrázok 2 Korelácia VAF vzoriek FFPE (vľavo) a krvi (vpravo) medzi prístrojmi MiSeqDx a NextSeq 550Dx s použitím rozboru 1



Tabuľka 20 Výsledky porovnania metód pomocou unikátnych vzoriek krvi a FFPE

Zdroj gDNA	Rozbor (panel Oligo)	Biologické replikáty (vzorky)	Technické replikáty (na vzorku)	Pozorovania (počet variantov)	Smernica	Priesečník	Korelácia (R ²)
Krv	Rozbor 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Krv	Rozbor 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Rozbor 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Rozbor 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Na základe uvedeného obmedzenia modulu na analýzu germinálnych variantov sa odstránili dva údajové body.

²Koeficient determinácie grafov VAF znázornený na obrázku 2.

Reprodukovateľnosť

Reprodukovateľnosť prístroja NextSeq 550Dx sa vyhodnotila s použitím vzoriek Platinum Genome reprezentatívnym rozborom určeným na vyhľadanie rôznych génov zahŕňajúcich 12 588 báz na 23 rôznych chromozómoch pomocou 150 amplicónov. Germinálne testovanie zahŕňalo 13 vzoriek; somatické testovanie pozostávalo zo šiestich replikátov siedmich vzoriek na rôznych úrovniach VAF. Vzorky sa pripravili pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testovanie sa vykonávalo na troch pracoviskách pomocou jednej šarže súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Na každom pracovisku sa použil jeden prístroj NextSeq 550Dx. Na každom pracovisku vykonávali testovanie dvaja operátori. Každý operátor vykonával testovanie každého typu vzorky tri po sebe idúce počiatkové dni. Spolu sa na troch pracoviskách vykonalo 36 chodov. Toto testovanie vyústilo do 18 chodov pre germinálny aj somatický pracovný postup.

Germinálny

Germinálne varianty s úrovňou VAF $\geq 0,2$ sa vykazujú ako pozitívne (variant). Pri očakávaných pozitívnych germinálnych variantoch sa vyhodnotili údaje zahŕňajúce mieru žiadnej primárnej analýzy a mieru správnej primárnej analýzy v rámci každého typu variantu (SNV, inzercia, delécia). Tabuľka 21 znázorňuje súhrn pozorovaných mier spoločne s dolnou a 95 % hornou úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre, pre každý typ variantu.

Tabuľka 21 Pozorovania germinálnych primárnych analýz pre očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu

Typ variantu	Žiadna primárna analýza			Správna pozitívna primárna analýza				
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Inzercie	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delécie	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Germinálne varianty s úrovňou VAF $< 0,2$ sa vykazujú ako negatívne (divokého typu). Pri očakávaných negatívnych germinálnych umiestneniach sa vyhodnotili údaje zahŕňajúce mieru žiadnej primárnej analýzy a mieru správnej primárnej analýzy divokého typu. Tabuľka 22 znázorňuje súhrn pozorovaných mier spoločne s dolnou a 95 % hornou úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 22 Pozorovania germinálnych primárnych analýz pre očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Žiadna primárna analýza			Správna negatívna primárna analýza				
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	95 % LCL	95 % UCL
Divokého typu	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Germinálne varianty s úrovňou VAF $\geq 0,2$ a $< 0,7$ sa pre daný variant označujú ako pozitívne heterozygotné, a varianty s úrovňou VAF $\geq 0,7$ sa pre daný variant označujú ako pozitívne homozygotné. Na stanovenie, či inherentná variabilita rozboru ovplyvní primárnu analýzu genotypu, sa použili germinálne vzorky s heterozygotnými variantmi. Pre obe medzné hodnoty sa stanovila hodnota Cx (0,2 pre heterozygotné a 0,7 pre homozygotné genotypy), kde x je podiel opakovaných testov, pri ktorých sa prekročila medzná hodnota. V prípade nižšej medznej hodnoty VAF 0,2 bola hodnota Cx $\geq 99,999$ %, čo znamená, že $\geq 99,999$ % heterozygotných variantov sa bude považovať za heterozygotné. Vzhľadom na hornú medznú hodnotu VAF 0,7 bola hodnota Cx $\leq 0,001$ %, čo znamená, že $\leq 0,001$ % heterozygotných variantov sa bude považovať za homozygotné. **Tabuľka 23** znázorňuje súhrn výsledkov podľa typu variantu.

Germinálne varianty s úrovňou VAF $\geq 0,2$ a $< 0,7$ sa pre daný variant označujú ako pozitívne heterozygotné, a varianty s úrovňou VAF $\geq 0,7$ sa pre daný variant označujú ako pozitívne homozygotné. Na stanovenie, či inherentná variabilita rozboru ovplyvní primárnu analýzu genotypu, sa použili germinálne vzorky s heterozygotnými variantmi. Pre obe medzné hodnoty sa stanovila hodnota Cx (0,2 pre heterozygotné a 0,7 pre homozygotné genotypy), kde x je podiel opakovaných testov, pri ktorých sa prekročila medzná hodnota. Vzhľadom na nižšiu medznú hodnotu VAF 0,2 bola hodnota Cx $\geq 99,999$ %, čo znamená, že $\geq 99,999$ % heterozygotných variantov sa bude považovať za heterozygotné. Vzhľadom na hornú medznú hodnotu VAF 0,7 bola hodnota Cx $\leq 0,001$ %, čo znamená, že $\leq 0,001$ % heterozygotných variantov sa bude považovať za homozygotné. **Tabuľka 23** znázorňuje súhrn výsledkov podľa typu variantu.

Tabuľka 23 Germinálne hodnoty Cx pre heterozygotné varianty

Typ variantu	Medzná hodnota VAF 0,2	Medzná hodnota VAF 0,7
	$\geq C99,999$ %	$\leq C0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Inzercie	24/24	24/24
Delécie	35/35	35/35
Spolu	153	153

Somatický

Somatické varianty s úrovňou VAF $\geq 0,026$ sa vykazujú ako pozitívne (variant). Pozorovania s úrovňou VAF $\geq 0,01$ a $< 0,026$ sa na účely tejto analýzy považovali za nejednoznačné (ani pozitívne ani negatívne, označené ako pozorovania s nízkou frekvenciou variantov). Na posúdenie výkonnosti sa výsledky vypočítali tromi spôsobmi:

- ▶ najlepší prípad: každý nejednoznačný výsledok sa považoval za správnu pozitívnu primárnu analýzu (zhoda s očakávanými výsledkami),
- ▶ najhorší prípad: každý nejednoznačný výsledok sa považoval za nesprávnu primárnu analýzu (nezhoda s očakávanými výsledkami),
- ▶ prípad vylúčenia: každý nejednoznačný výsledok sa vylúčil z analýzy.

V troch tabuľkách, **Tabuľka 24**, **Tabuľka 25** a **Tabuľka 26**, je uvedený súhrn výsledkov primárnej analýzy pri najlepšom prípade, najhoršom prípade a prípade vylúčenia, a to spoločne s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou metódou Wilsonovho skóre.

Tabuľka 24 Pozorovania somatických primárnych analýz pre očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (najlepší prípad)

Typ variantu	Správna pozitívna primárna analýza				
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzercie	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabuľka 25 Pozorovania somatických primárnych analýz pre očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (najhorší prípad)

Typ variantu	Správna pozitívna primárna analýza				
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzercie	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabuľka 26 Pozorovania somatických primárnych analýz pre očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (odstránené nejednoznačné primárne analýzy)

Typ variantu	Správna pozitívna primárna analýza				
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzercie	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delécie	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatické varianty s úrovňou VAF < 0,01 sa vykazujú ako negatívne primárne analýzy (divokého typu). Pri očakávaných negatívnych somatických umiestneniach sa vyhodnocovali údaje zahŕňajúce mieru žiadnej primárnej analýzy a mieru správnej primárnej analýzy divokého typu. Správne primárne analýzy divokého typu sa stanovili vylúčením žiadnych primárnych analýz, odpočítaním pozorovaných primárnych analýz, ktoré spadali do nejednoznačnej zóny (úrovne VAF $\geq 0,01$ a < 0,026), ako aj nesprávnych primárnych analýz, ktoré sa nachádzali nad medznou hodnotou (úroveň VAF $\geq 0,026$) z celkového počtu. [Tabuľka 27](#) znázorňuje súhm pozorovaných, celkových a percentuálnych výsledkov negatívnych somatických umiestnení pre mieru žiadnej primárnej analýzy a mieru správnej primárnej analýzy divokého typu spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou metódou Wilsonovho skóre.

Tabuľka 27 Pozorovania somatických primárnych analýz pre očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Žiadna primárna analýza			Správna primárna analýza						
	Počet pozorovaných	Spolu	Percento	Nejed- noznačná	Ne- správna	Správna	Spolu	Per- cento	95 % LCL	95 % UCL
Divokého typu	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Na zistenie C95 rozboru (v rámci každého typu variantu) sa vyhodnotili somatické vzorky na rôznych úrovniach VAF pre rovnaký variant. Na vyhodnotenie variability v blízkosti medznej hodnoty rozboru sa použili vzorky s očakávanými úrovňami VAF od 0,02 do 0,07. Pre každý variant sa stanovila hodnota C95, pričom najvyššiu hodnotu C95 pre každý typ variantu predstavovala hodnota, ktorú znázorňuje [Tabuľka 28](#).

Tabuľka 28 Súhm somatických hodnôt C95

Typ variantu	N	C95
SNV	74	0,0613
Inzercia	24	0,0573
Delécia	33	0,0575

Výkonnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov)

Základné informácie

Prístroj NextSeq 550Dx podporujú dve súpravy reagensí: súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). S cieľom preukázať, že súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) dokáže splniť požiadavky na analytickú výkonnosť overenú a potvrdenú pri súprave reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov), vykonali sa štúdie so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx sa pripravili dve knižnice, jedna s využitím germinálneho pracovného postupu a druhá s využitím somatického pracovného postupu. Knižnice z každého pracovného postupu sa testovali na troch prístrojoch NextSeq 550Dx s tromi šaržami súprav reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Testovanie každého pracovného postupu navyše zahŕňalo jeden chod so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Analytická citlivosť (Medza blanku [LoB] a medza detekcie [LoD])

Overenie so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) ukázalo, že prístroj NextSeq 550Dx dokáže detegovať varianty pri VAF 0,05 s chybou typu II $\leq 0,05$ a že medzná hodnota VAF 0,026, ktorú používa modul na analýzu somatických variantov (účinná LoB), podporuje chybu typu I $\leq 0,01$. Na základe týchto tvrdení sa očakáva, že variant s VAF 0,05 je v 95 % prípadov rovnaký alebo väčší ako s VAF 0,026 a že pozícia divokého typu predstavuje v 99 % prípadov VAF menšiu ako 0,026. S cieľom potvrdiť, že súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) zodpovedá týmto tvrdeniam, vykonali sa na prístroji NextSeq 550Dx so súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) opakované merania s divokým typom vzoriek (vzorky LoB) a so vzorkami obsahujúcimi varianty pri VAF 0,05 (vzorky LoD). Podiel primárnych analýz nad medznou hodnotou 0,026 alebo pod ňou sa potom porovnal s tvrdeniami stanovenými súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Testovanie zahŕňalo dve vzorky LoD, každú s unikátnou skupinou variantov cielenou na VAF 0,05 a zodpovedajúcou vzorkám LoB, ktoré boli pri cielených variantoch divokého typu. Na prípravu knižníc sa pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx spracovalo osem replikátov vzoriek LoD a sedem replikátov vzoriek LoB. Knižnice sa najprv sekvenovali pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) s cieľom identifikovať varianty/genomické súradnice na vyhodnotenie LoB/LoD pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov). Na základe výsledkov súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) sa všetky varianty s priemernou VAF 0,045 – 0,055 (varianty LoD) použili na analýzu LoD (N = 51 variantov). Pri analýze LoB sa posúdilo 51 zodpovedajúcich genomických súradníc.

Na vyhodnotenie súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) sa knižnice sekvenovali v troch chodoch tri po sebe idúce dni na rovnakom prístroji a s použitím rovnakej šarže súpravy reagensí. Testovanie predstavovalo 24 replikátov každého z 51 variantov LoD a 21 replikátov každej zo zodpovedajúcich pozícií divokého typu. Podiely primárnych analýz divokého typu s VAF < 0,026 znázorňuje [Tabuľka 29](#). Podiely primárnych analýz variantov LoD s VAF minimálne 0,026 znázorňuje [Tabuľka 30](#).

Tabuľka 29 Podiel primárnych analýz < 0,026 pre pozície divokého typu (vyhodnotenie tvrdenia LoB)

Typ variantu	Vyhodnotené pozície	Celkový počet pozorovaní	Počet meraní VAF ≥ 2,6 %	Podiel < 2,6 %	Podiel 95 % Interval spoľahlivosti
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Inzercia	11	231	0	1	0,984 – 1
Delécia	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabuľka 30 Podiel primárnych analýz ≥ VAF 0,026 pri variantoch LoD (vyhodnotenie tvrdenia LoD)

Typ variantu	Vyhodnotené pozície	Celkový počet pozorovaní	Počet meraní VAF < 2,6 %	Počet meraní VAF ≥ 2,6 %	Podiel ≥ 2,6 %	Podiel 95 % Interval spoľahlivosti
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Inzercia	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delécia	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Správnosť

Germinálny

Na posúdenie správnosti primárnej analýzy variantov pomocou modulu na analýzu germinálnych variantov na prístroji NextSeq 550Dx s použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) sa vykonala táto štúdia. Pomocou reprezentatívneho rozboru sa testovalo dvanásť unikátnych vzoriek Platinum Genome. Sekvenovanie sa vykonávalo na troch prístrojoch NextSeq 550Dx s tromi súpravami reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) a dosiahlo sa celkovo 11 chodov.

Porovnaním výsledkov s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou, Platinum Genomes vo verzii 2016- 1.0, sa stanovila správnosť SNV, inzercii a delécií. Na referenčné účely sa uvádzajú výsledky správnosti z jedného sekvenovacieho chodu pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Súhrn výsledkov znázorňuje [Tabuľka 31](#).

Tabuľka 31 Súhrn germinálnej zhody

Kritériá	Celkový počet pozorovaní (v2.5) ¹	Výsledok podľa pozorovania (v2.5) ²	Výsledok podľa pozorovania (v2) ³	Výsledok podľa chodu (v2.5) ⁴	Výsledok podľa chodu (v2) ⁴
PPA pre SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA pre inzercie	1056	100	100	100	98,9
PPA pre delécie	1056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Vypočítané ako počet vzoriek na chod x počet chodov (96 vzoriek na chod x 11 chodov = 1056 pozorovaní).

²Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátu vzorky v rámci všetkých chodov (na základe 11 chodov pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátu vzorky v rámci 1 chodu (spolu 96 pozorovaní).

⁴Najnižšia hodnota pri súhrnnej analýze údajov z každého chodu.

Somatický

Na posúdenie správnosti primárnej analýzy variantov modulu na analýzu somatických variantov na prístroji NextSeq 550Dx s použitím súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) sa použila táto štúdia. Desať vzoriek Platinum Genome FFPE (dve s variantmi zriedenými na VAF 0,05) sa testovalo pomocou reprezentatívneho rozboru. Sekvenovanie sa vykonávalo na troch prístrojoch NextSeq 550Dx s troma šaržami súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) a dosiahlo sa celkovo 11 sekvenovacích chodov.

Porovnaním výsledkov s dobre charakterizovanou kompozitnou referenčnou metódou, Platinum Genomes vo verzii 2016- 1.0, sa stanovila správnosť SNV, inzercii a delécií. Na referenčné účely sa uvádzajú výsledky správnosti z jedného sekvenovacieho chodu pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov). Súhrn výsledkov znázorňuje [Tabuľka 32](#).

Tabuľka 32 Súhrn somatickej zhody

Kritériá	Celkový počet pozorovaní (v2.5) ¹	Výsledok podľa pozorovania (v2.5) ²	Výsledok podľa pozorovania (v2) ³	Výsledok podľa chodu (v2.5) ⁴	Výsledok podľa chodu (v2) ⁴
PPA pre SNV	528	100	100	100	100
PPA pre inzercie	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA pre delécie	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

¹Vypočítané ako počet vzoriek na chod x počet chodov (48 vzoriek na chod x 11 chodov = 528 pozorovaní).

²Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátu vzorky v rámci všetkých chodov (na základe 11 chodov pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátu vzorky v rámci 1 chodu (spolu 96 pozorovaní).

⁴Najnižšia hodnota pri súhrnnej analýze údajov z každého chodu.

Presnosť

Germinálny

Presnosť súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) pomocou modulu na analýzu germinálnych variantov sa vyhodnotila pomocou vzoriek Platinum Genome a reprezentatívneho rozboru. Testovanie pozostávalo z prípravy jednej knižnice pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a použilo sa 12 vzoriek, pričom sa každá spracovala s ôsmimi replikátmi. Knižnice sa sekvenovali na troch prístrojoch NextSeq 550Dx s troma šaržami súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) a dosiahlo sa celkovo deväť sekvenovacích chodov.

Na stanovenie, či inherentná variabilita rozboru ovplyvní primárnu analýzu genotypu (N = 153 unikátnych heterozygotných variantov), sa použili vzorky s heterozygotnými variantmi. Pre obe medzné hodnoty modulu na analýzu germinálnych variantov sa stanovila hodnota Cx (0,2 pre heterozygotné a 0,7 pre homozygotné genotypy), kde x je podiel opakovaných testov, pri ktorých sa prekročila medzná hodnota. V prípade nižšej medznej hodnoty VAF 0,2 bol variant s minimálnou hodnotou Cx pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) > 99,9 %, čo znamená, že > 99,9% heterozygotných variantov sa bude považovať za heterozygotné. V prípade vyššej medznej hodnoty VAF 0,7 predstavoval variant s maximálnou medznou hodnotou Cx pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) < 1,5 %, čo znamená, že ≤ 1,5 % heterozygotných variantov sa bude považovať za homozygotné. [Tabuľka 33](#) znázorňuje súhrn výsledkov podľa typu variantu. Na referenčné účely sa uvádzajú hodnoty Cx z jedného sekvenovacieho chodu pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Tabuľka 33 Germinálne hodnoty Cx pre heterozygotné varianty

Typ variantu	N	Medzná hodnota VAF 0,2		Medzná hodnota VAF 0,7	
		Min. Cx (v2.5) ¹	Min. Cx (v2) ²	Max. Cx (v2.5) ¹	Max. Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Inzercie	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Delécie	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Hodnoty Cx založené na odhadoch celkovej štandardnej odchýlky z analýzy rozptylu komponentov.

²Hodnoty Cx založené na štandardných odchýlkach vzoriek.

Somatický

Presnosť súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) pomocou modulu na analýzu somatických variantov sa vyhodnotila pomocou vzoriek Platinum Genome FFPE a reprezentatívneho rozboru.

Testovanie pozostávalo z prípravy jednej knižnice pomocou súpravy TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a použili sa dve vzorky, pričom sa každá spracovala s ôsmimi replikátmi. Knižnice sa sekvenovali na troch prístrojoch NextSeq 550Dx s tromi šaržami súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) a dosiahlo sa celkovo deväť sekvenovacích chodov.

Na hodnotenie variability prístroja s takmer medznou hodnotou VAF modulu na analýzu somatických variantov (somatické varianty s úrovňou VAF $\geq 0,026$ sa pre variant označujú ako pozitívne) sa použili somatické varianty s očakávanými úrovňami VAF $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unikátnych variantov). Pre každý somatický variant sa stanovili hodnoty C95. Hodnoty C95 predstavujú VAF, pri ktorej je 95 % pravdepodobnosť, že bude väčšia ako medzná hodnota VAF modulu na analýzu somatických variantov. Najvyššie hodnoty C95 podľa typu variantu znázorňuje [Tabuľka 34](#). Na referenčné účely sa uvádzajú výsledky C95 z jedného sekvenovacieho chodu pomocou súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov).

Tabuľka 34 Súhrn somatických hodnôt C95

Typ variantu	Počet vyhodnotených variantov	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Inzercie	24	0,062	0,061
Delécie	33	0,060	0,060

¹Hodnoty C95 založené na odhadoch celkovej štandardnej odchýlky z analýzy rozptylu komponentov.

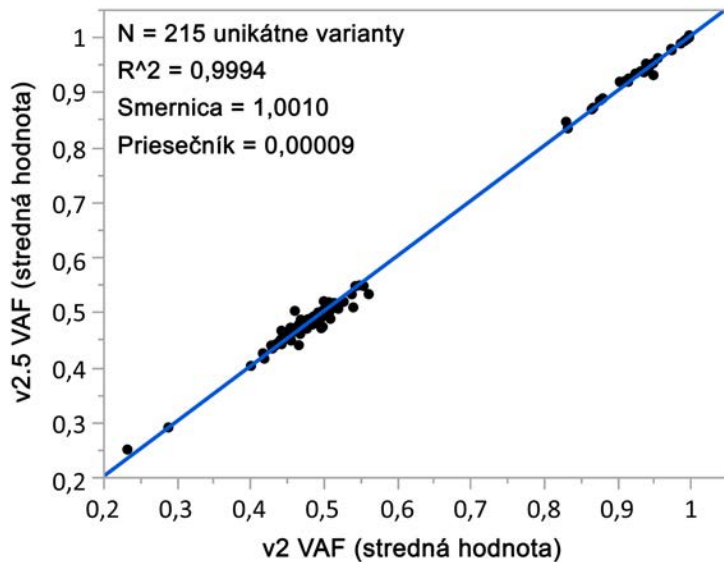
²Hodnoty C95 založené na štandardných odchýlkach vzoriek.

Porovnanie metód (súprava reagencií)

Germinálny

Z výsledkov vygenerovaných modulom na analýzu germinálnych variantov sa pomocou súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravy reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) vyhodnotili priemerné frekvencie variančných alel 215 unikátnych variantov. Priemery VAF sa vypočítali z 11 sekvenovacích chodov (v2.5) a jedného sekvenovacieho chodu (v2). Na výpočet priemeru každého variantu sa použilo aspoň osem replikátov. [Obrázok 3](#) znázorňuje koreláciu VAF medzi týmito dvoma súpravami reagencií. Na základe silnej lineárnej korelácie VAF a podobnosti výsledkov medzi súpravami reagencií sa stanovilo, že výkonnostné charakteristiky pôvodne overené a potvrdené súpravou reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a modulom na analýzu germinálnych variantov sú použiteľné pre súpravu reagencií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

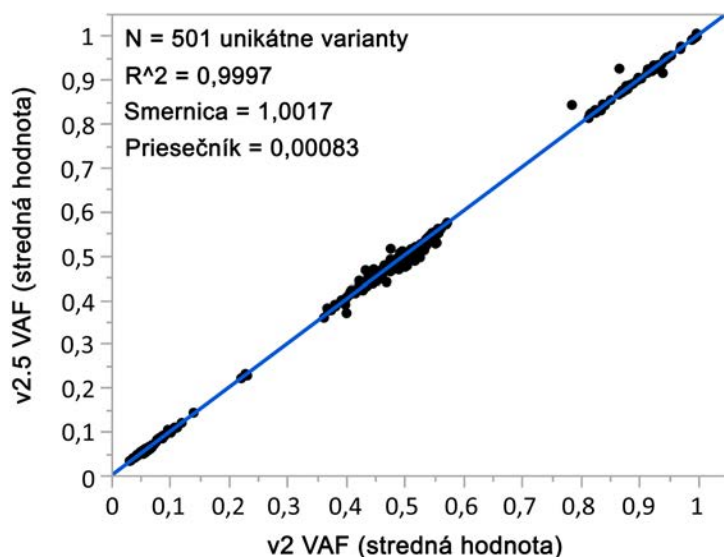
Obrázok 3 Korelácia frekvencie variantných alel (VAF) podľa modulu na analýzu germinálnych variantov medzi súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).



Somatický

Z výsledkov vygenerovaných modulom na analýzu somatických variantov sa pomocou súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravy reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) vyhodnotili priemerné frekvencie variantných alel 501 unikátnych variantov. Priemery VAF sa vypočítali z 11 sekvenovacích chodov (v2.5) a jedného sekvenovacieho chodu (v2). Na výpočet priemeru každého unikátneho variantu sa použili aspoň tri replikáty. **Obrázok 4** znázorňuje koreláciu VAF medzi týmito dvoma súpravami reagensí. Na základe korelácie VAF a podobnosti výsledkov medzi súpravami reagensí sa stanovilo, že výkonnostné charakteristiky overené a potvrdené súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a modulom na analýzu somatických variantov sú použiteľné pre súpravu reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).

Obrázok 4 Korelácia frekvencie variantných alel (VAF) podľa modulu na analýzu somatických variantov medzi súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklov) a súpravou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov).



Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním výrobku (výrobkov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovat akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takeéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATELOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLYVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU POPÍSANÉHO VÝROBKU (VÝROBKOV) (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

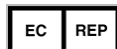
© 2021 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornia 92122 USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

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

Označenie produktov

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktov, nájdete v kľúči symbolov na webovej adrese support.illumina.com na karte *Documentation and Literature* (Dokumentácia a literatúra) príslušnej súpravy.