

## Листовка

ЗА ИНВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗНОС.

**Каталожен № 20005715**

## Предназначение

Инструмент NextSeq 550Dx е предназначен за секвениране на ДНК библиотеки, когато се използва с *инвитро* диагностични анализи. Инструмент NextSeq 550Dx трябва да се използва с конкретни регистрирани, сертифицирани или одобрени *инвитро* диагностични реагенти и аналитичен софтуер.

## Принципи на процедурата

Illumina Инструмент NextSeq 550Dx е предназначен за секвениране на ДНК библиотеки с *инвитро* диагностични анализи и за употреба от квалифициран лабораторен персонал, обучен в използването на *инвитро* диагностични процедури, извършвани в клинична лаборатория. За входни данни NextSeq 550Dx използва библиотеки, генерирани от ДНК, където индексите за проби и секвенциите за заснемане се добавят към амплифицирани цели. Библиотеките с проби се заснемат върху поточна клетка и се секвенират на инструмента, като се използва секвениране чрез синтеза (SBS) химия. SBS химията използва метод с обратим терминатор за откриване на белязани флуоресцентно единични нуклеотидни бази, тъй като те са включени в нарастващи ДНК вериги. Софтуерът Real-Time Analysis (RTA) извършва анализ на изображения и обозначаване на бази и задава резултат за качество на всяка база за всеки цикъл на секвениране. Когато първичният анализ приключи, може да бъде извършен вторичен анализ на инструмента за обработване на обозначаванията на бази. NextSeq 550Dx използва различни модули за вторичен анализ в зависимост от работния процес. За модулите Germline и Somatic Variant Module обработването включва демултиплексиране, генериране на FASTQ файлове, подравняване, обозначаване на варианти и генериране на файлове с формат за обозначаване на вариант (VCF и gVCF). Файловете с формат VCF и gVCF съдържат информацията относно варианти, открити на конкретни позиции в референтен геном.

## Конфигурация на двойно зареждане

NextSeq 550Dx включва конфигурация на двойно зареждане, за да позволи употребата на инструмента в диагностичен (Dx) режим или в режим само за изследователска употреба (RUO). *Инвитро* диагностичните анализи на секвениране, включително модулите Germline и Somatic Variant Module, се извършват в диагностичен режим. В диагностичен режим могат да бъдат използвани само IVD реагенти

за секвениране. Характеристиките на производителността и ограниченията на процедурата за инструмента NextSeq 550Dx са установени с помощта на модули Germline и Somatic Variant Module в диагностичен режим.

## Ограничения на процедурата

1. За *инвитро* диагностична употреба.
2. Когато се използват с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) или NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла), модулите Germline и Somatic Variant Module могат да предоставят:
  - Изходно секвениране  $\geq 90$  гигабази (Gb)
  - Дължина на разчитане (в изпълняване със сдвоени краища) 2 x 150 двойки бази (bp)
  - Бази равни или по-големи от Q30  $\geq 75\%$  при дължина на разчитане от 2 x 150 bp  
Бази равни или по-големи от 75% имат резултат за качество по скалата на Phred  $\geq 30$ , което показва точност на обозначаване на бази над 99,9%
3. Разчитания с индели (инсерции, делеции или комбинации), където дължината на съдържанието е  $> 25$  bp, не се подравняват от софтуера за анализ. Следователно инделите с дължина  $> 25$  bp не могат да бъдат открити от софтуера за анализ.
4. Разчитането на ампликони с изключително съдържание на варианти може да не бъде подравнено от софтуера за анализ, в резултат на което регионът се отчита като див тип. Такова изключително съдържание включва:
  - Разчитания, съдържащи повече от три индела
  - Разчитания с дължина най-малко 30 bp със съдържание на еднонуклеотиден вариант (SNV)  $> 4\%$  от общата дължина на ампликона (без регионите на сондата)
  - Разчитания с дължина  $< 30$  bp със съдържание на SNV  $> 10\%$  от общата дължина на ампликона (включително регионите на сондата)
5. Големи варианти, включително многонуклеотидни варианти (MNV) и големи индели, могат да бъдат докладвани като отделни по-малки варианти в изходния VCF файл.
6. Вариантите на делеции могат да бъдат филтрирани или пропуснати, когато обхващат два ампликона с плочки, ако дължината на делецията е по-голяма или равна на припокриването между ампликоните с плочки.
7. Системата не може да открие индели, ако се появят в непосредствена близост до праймер и няма припокриващ се ампликон. За региони с припокриващи се ампликони анализът не може да открие делеции, когато регионът на припокриване е по-малък от размера на делецията, която трябва да бъде открита. Например, ако областта на припокриване между два съседни ампликона е две бази, анализът не може да открие никакви делеции, включително и двете бази. Може да се открие делеция на една база в която и да е от тези бази.

8. Както при всеки работен процес за приготвяне на библиотека, базиран на хибридизация, основните полиморфизми, мутации, инсерции или делеции в региони, свързващи олигонуклеотиди, могат да повлияят на изследваните алели и на обозначаванията, направени по време на секвенирането. Например:
  - Вариант във фаза с вариант в региона на праймера може да не се амплифицира, което води до фалшиво отрицателен резултат.
  - Вариантите в региона на праймера могат да предотвратят амплифицирането на референтния алел, което води до неправилно обозначаване на хомозиготен вариант.
  - Вариантите на индели в региона на праймера може да причинят фалшиво положително обозначаване в края на разчитането в съседство с праймера.
9. Инделите могат да бъдат филтрирани поради отклонение на верига, ако се появят в края на едно разчитане и са изрязани по време на подравняването.
10. Малките MNV не са валидирани и се отчитат само в Somatic Variant Module.
11. Делециите се отчитат във VCF в координатата на предходната база за VCF формат. Следователно помислете за прилежащи варианти, преди да отчетете, че отделно обозначаване на бази е хомозиготна референция.
12. Специфични ограничения за герминативна линия:
  - Инструмент NextSeq 550Dx, използващ Germline Variant Module на Local Run Manager за NextSeq 550Dx, е проектиран да осигури качествени резултати за обозначаване на вариант на герминативна линия (т.е. хомозиготен, хетерозиготен, див тип).
  - Когато се използва с Germline Variant Module, минималното покритие на ампликон, необходимо за точното обозначаване на вариант, е 150x. В резултат на това са необходими 150 поддържащи фрагмента на ДНК, което е еквивалентно на 300 припокриващи се разчитания на сдвоени краища. Броят на пробите и общият брой целеви бази влияят върху покритието. Съдържанието на гуанин-цитозин и друго геномно съдържание могат да повлияят на покритието.
  - Варирането на броя копия може да повлияе на това дали вариантът е идентифициран като хомозиготен или хетерозиготен.
  - Вариантите в определен повтарящ се контекст се филтрират във VCF файловете. Филтърът за повторения R<sub>M</sub>xN се използва за филтриране на варианти, ако цялата или част от секвенциите на вариантите присъства многократно в референтния геном, съседен на позицията на варианта. Изискват се поне девет повторения в препратката за обозначаване на вариант за герминативна линия. Вземат се предвид само повторения с дължина до 5 bp (R<sub>5</sub>x9).
  - Индел и SNV в един локус могат да доведат до докладване само на един вариант.
13. Ограничения за конкретен соматичен вариант.
  - Инструмент NextSeq 550Dx, използващ Somatic Variant Module на Local Run Manager за NextSeq 550Dx, е проектиран да предоставя качествени резултати за обозначаване на соматични варианти (т.е. наличие на соматичен вариант с честота на вариант, която е по-голяма или равна на 0,026 с граница на откриване 0,05).

- Когато се използва със Somatic Variant Module, минималното покритие на ампликон, необходимо за точното обозначаване на вариант, е 450x за олигонуклеотидно обединяване. В резултат на това са необходими 450 поддържащи фрагмента на ДНК на олигонуклеотидно обединяване, което е еквивалентно на 900 припокриващи се разчитания на сдвоени краища. Броят на пробите и общият брой целеви бази влияят върху покритието. Съдържанието на гуанин-цитозин и друго геномно съдържание могат да повлияят на покритието.
- Изискват се поне шест повторения в препратката за обозначаване на соматичен вариант и се вземат предвид само повторения с дължина до 3 bp (R3x6).
- Модулът за соматичен вариант не може да разграничава варианти на герминативна линия и соматични варианти. Модулът е предназначен да открива варианти в диапазон от вариантни честоти, но вариантната честота не може да се използва за разграничаване на соматичните варианти от вариантите на герминативна линия.
- Нормалната тъкан в материала за изследване влияе върху откриването на варианти. Отчетената граница за откриване се основава на вариантната честота спрямо общата ДНК, извлечена както от тумор, така и от нормална тъкан.

## Компоненти на продукта

Illumina NextSeq 550Dx се състои от следното:

1. Инструмент NextSeq 550Dx (Каталожен № 20005715)
2. Софтуерни компоненти за Инструмент NextSeq 550Dx, включително следните:

Софтуерно приложение	Функция	Описание
Работен софтуер NextSeq 550Dx (NOS)	Контролира работата на инструмента	Софтуерното приложение NOS управлява работата на инструмента по време на секвениране и генерира изображения за употреба от софтуера Real-time Analysis (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Изпълнява основен анализ	Софтуерното приложение RTA преобразува изображенията, генерирани от NOS за всяка плочка за цикъл на изпълняване на секвениране, във файлове за обозначаване на бази, които са входове за модулите за анализ на Local Run Manager. Софтуерното приложение RTA не съдържа потребителски интерфейс.
Local Run Manager	Интерфейс за избиране на модул	Софтуерът Local Run Manager е вградено интегрирано решение за управление на потребители, избор на подходящия модул за анализ и мониторинг на състоянието.

Софтуерно приложение	Функция	Описание
Somatic Variant Module	Изпълнява вторичен анализ	Този софтуер на модула за анализ Local Run Manager обработва обозначавания на бази чрез вторичен анализ. Обработването включва демултиплексиране, създаване на FASTQ файлове, подравняване, обозначаване на вариант и докладване. Инструментът за обозначаване на вариант (Pisces) генерира VCF файлове, които съдържат информацията относно вариантите, открити на специфични позиции в референтния геном, и включва измерената вариантна честота.
Germline Variant Module	Изпълнява вторичен анализ	Този софтуер на модула за анализ Local Run Manager обработва обозначавания на бази чрез вторичен анализ. Обработването включва демултиплексиране, създаване на FASTQ файлове, подравняване, обозначаване на вариант и докладване. Инструментът за обозначаване на вариант (Pisces) генерира VCF файлове, които съдържат информацията относно вариантите, открити на специфични позиции в референтния геном и идентифицира всеки вариант като хетерозиготен или хомозиготен.

3. **Незадължително** Сървър Illumina DRAGEN за NextSeq 550Dx (каталожен № 20086130), включително следния софтуерен компонент:

Софтуерно приложение	Функция	Описание
Illumina Run Manager	Интерфейс за избор на модул на приложение	Софтуерът Illumina Run Manager е инсталиран на незадължителен сървър DRAGEN извън инструмента. Illumina Run Manager дава възможност за управление от потребителя, избор на модул за анализ и мониторинг на изпълнението на секвенирането и състоянието на анализа.

Незадължителният сървър Illumina DRAGEN за NextSeq 550Dx се предлага само в избрани държави. Свържете се с представител на Illumina за регионална наличност.

## Условия на работа

За повече информация относно условията на работа вижте раздела Съображения по отношение на околната среда в *NextSeq 550Dx Instrument Site Prep Guide* (Ръководство за подготовка на работното място на инструмента) (документ № 1000000009869).

Елемент	Спецификация
Температура	Поддържайте лабораторна температура от 19°C до 25°C (22°C ±3°C). Тази температура е работната температура на инструмента. По време на изпълняване не позволявайте околната температура да варира с повече от ±2°C.
Влага	Поддържайте некондензираща относителна влажност в диапазона 20 – 80%.

## Оборудване и материали

### Необходимо оборудване и материали, продавани отделно

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 цикъла), каталожен № 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла), каталожен № 20028871

### Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени

#### Доставяни от потребителя консумативи за изпълняване на секвениране

Консуматив	Доставчик	Цел
Кърпички със спирт, 70% изопропилов или Етанол, 70%	VWR, каталожен № 95041-714 (или еквивалент) Общ лабораторен доставчик	Почистване на поточната клетка и за общи цели
Лабораторни кърпи, без власинки	VWR, каталожен № 21905-026 (или еквивалент)	Почистване на поточната клетка и за общи цели

#### Доставяни от потребителя консумативи за поддръжка на инструмента

Консуматив	Доставчик	Цел
NaOCl, 5% (натриев хипохлорит)	Sigma-Aldrich, каталожен № 239305 (или лабораторен клас еквивалент)	Измиване на инструмента с ръчно измиване след изпълняване; разреден до 0,12%

Консуматив	Доставчик	Цел
Tween 20	Sigma-Aldrich, каталожен № P7949	Измиване на инструмента с опциите за ръчно измиване; разреден до 0,05%
Вода, лабораторен клас	Общ лабораторен доставчик	Измиване на инструмента (ръчно измиване)
Въздушен филтър	Illumina, каталожен № 20063988	Почистване на въздуха, който инструментът поема за охлаждане

## Насоки за лабораторен клас вода

Винаги използвайте лабораторен клас вода или дейонизирана вода за извършване на процедури по инструмента. Никога не използвайте чешмяна вода. Използвайте само следните класове вода или еквиваленти:

- Дейонизирана вода
- Illumina PW1
- 18 мегаома (MΩ) вода
- Milli-Q вода
- Super-Q вода
- Клас вода за молекулярна биология

## Предупреждения и предпазни мерки



### ВНИМАНИЕ

Федералното законодателство ограничава това изделие да се продава от или по предписание на лекар или друг специалист, лицензиран от закона на държавата, в която практикува, да използва или предписва използването на изделието.

1. Някои компоненти на реагентите, предоставени от Illumina за използване с Инструмент NextSeq 550Dx, съдържат потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реактиви като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационните листове за безопасност (SDS) на адрес [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
2. Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентните органи на държавите членки, в които са се установили потребителят и пациентът.

3. Работете с всички кръвни проби така, сякаш е известно, че са заразни за човешкия имунодефицитен вирус (ХИВ), вируса на човешкия хепатит В (ХБВ) и други патогенни агенти, пренасяни в кръвта (универсални предпазни мерки).
4. Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на пробата.
5. Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с материали за изследване и комплекти с реагенти. Измийте внимателно ръцете си след работа с материали за изследване и комплекти с реагенти.
6. Необходими са подходящи лабораторни практики и добра лабораторна хигиена, за да се предотврати замърсяването на продуктите от PCR с реагенти, апаратура и геномни ДНК проби. PCR замърсяването може да доведе до неточни и ненадеждни резултати.
7. За да предотвратите замърсяване, се уверете, че предамплификационните и следамплификационните зони разполагат със специално оборудване и консумативи (напр. пипети, накрайници за пипети, термоблокове, завихрящи миксери и центрофуги).
8. Сдвояването на индекс с проба трябва да съвпада точно с отпечатаната подредба на плаката. Local Run Manager автоматично попълва индексните праймери, свързани с имената на проби, когато се въвеждат в модула. Съветваме потребителя да провери индексните праймери, свързани с проби, преди да започне изпълняването на секвениране. Несъвпаденията между пробата и оформлението на плочата водят до загуба на положителна идентификация на пробата и неправилно отчитане на резултатите.
9. Инсталирането на осигурен от потребителя антивирусен софтуер е силно препоръчително за защита на компютъра от вируси. Направете справка с ръководството на потребителя за инструкции относно инсталирането.
10. Не работете с NextSeq 550Dx, ако който и да е от панелите му е премахнат. Ако използвате инструмента, докато някой от панелите е премахнат, това може да доведе до излагане на линейно напрежение и постояннотокови напрежения.
11. Не докосвайте станцията на поточната клетка в отделението за поточни клетки. Нагревателят в това отделение работи при температура между 22°C и 95°C и може да доведе до изгаряния.
12. Инструментът тежи приблизително 84 kg (185 lbs) и може да причини сериозни наранявания при изпускане или неправилно боравене.

## Инструкции за употреба

Следните инструкции за употреба на Инструмент NextSeq 550Dx изискват реагенти, предоставени в NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) или NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 цикъла).



## Създаване на изпълняване

Създайте изпълняване на секвениране с помощта на Local Run Manager или Illumina Run Manager. Инструкциите за употреба на Local Run Manager са включени по-долу и в NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочно ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513). За инструкции как да създадете изпълняване с помощта на Illumina Run Manager, вижте Illumina Run Manager за софтуерно ръководство NextSeq 550Dx (документ № 200025239).

За инструкции относно избора между Local Run Manager или Illumina Run Manager, вижте Illumina Run Manager за софтуерно ръководство NextSeq 550Dx (документ № 200025239). За подробни инструкции относно конкретни приложения вижте модула или ръководството за приложението за конкретния анализ.

Следните инструкции се отнасят до използването на модулите Germline и Somatic Variant на Local Run Manager.

### Задаване на параметри

1. Влезте в Local Run Manager.
2. Изберете **Create Run** (Създаване на изпълняване) и изберете **Somatic Variant** (Соматичен вариант) или **Germline Variant** (Вариант за герминативна линия).
3. Въведете име на изпълняването, което го идентифицира от секвенирането до анализа. Използвайте буквено-цифрови знаци, интервали, долни черти или тирета.
4. [Незадължително] Въведете описание на изпълняването, за да подпомогнете идентифицирането на изпълняването. Използвайте буквено-цифрови знаци, интервали, долни черти или тирета.
5. Изберете броя на проби и индексния комплект от падащия списък. Имайте предвид следната информация, когато правите избор.
  - Падащият списък съдържа броя проби с индексен комплект. Например 24-Set 1 (24 – комплект 1) показва, че ще бъдат изследвани 24 проби с индекси от индексен комплект 1.
  - Номерата на индексния комплект се отнасят до различни комплекти от i5 и i7 индексни двойки. Както комплект 1, така и комплект 2 осигуряват индексно разнообразие. Двата индексни комплекта се предлагат, за да подпомогнат предотвратяването на изчерпването на единичен комплект.
  - Изберете броя проби, които са най-близо до броя проби, които изследвате. Ако точният брой на проби не е в списъка, изберете броя, който е най-близо, но по-малък от броя, който изследвате. Например, ако искате да изследвате 18 проби, изберете 16 проби.
  - Предложените ямки за проби и индексните комбинации, които отговарят на изискванията за индексно разнообразие, се осветяват в зелено.

### Импортиране на манифестни файлове за изпълняването

1. Уверете се, че манифестите, които искате да импортирате, са налични на достъпно мрежово местоположение или на USB устройство.
2. Изберете **Import Manifests** (Импортиране на манифести).
3. Навигирайте до манифестния файл и изберете манифестите, които искате да добавите.

**ЗАБЕЛЕЖКА** За да направите манифестни файлове, налични за всички изпълнявания, чрез използване на модула за анализ на вариант за герминативна линия или на соматичния вариант, добавете манифестните файлове чрез функцията Module Settings (Настройки на модул). Тази функция изисква разрешения на администраторско ниво. За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочно ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513)*.

## Посочване на проби за изпълняването


Посочете пробите за изпълняването чрез една от опциите и указанията, които следват.

**Enter samples manually** (Ръчно въвеждане на пробите) – Използвайте празната таблица на екрана Create Run (Създаване на изпълняване).


**Import samples** (Импортиране на проби) – Посочете път до външен файл във формат със стойности, разделени със запетая (\*.csv). На екрана Create Run (Създаване на изпълняване) се предлага шаблон за изтегляне.

## Ръчно въвеждане на пробите

1. Въведете уникално име на пробата (*модул за анализ на соматичен вариант*) или идентификатор на проба (*модул за анализ на вариант на герминативна линия*).  
Използвайте буквено-цифрови символи, тирета или долни черти.
2. [Незадължително] За положителни или отрицателни контролни проби щракнете с десния бутон на мишката и изберете типа на контролата.  
Контролата в една ямка за проби попълва автоматично съответната ямка в другото обединяване със същата контрола.
3. [Незадължително] Въведете описание на пробата в раздела Sample Description (Описание на пробата).  
Използвайте буквено-цифрови символи, тирета или долни черти.
4. Изберете Index 1 adapter (Индекс 1 адаптер) от падащия списък Index 1 (i7) (Индекс 1 (i7)).  
Когато използвате предложените ямки за проби, софтуерът попълва автоматично индексни адаптери i7 и i5, които отговарят на изискванията на индекса за разнообразие. Ако точният брой проби, които изследвате, не е в списъка, се постарайте да изберете индексни адаптери за допълнителни ямки.

5. Изберете Index 2 adapter (Индекс 2 адаптер) от падащия списък Index 2 (i5) (Индекс 2 (i5)).
6. Изберете манифестен файл от падащия списък Manifest (Манифест).  
Пробите от Pool A (Обозначаване А) изискват различен манифест от пробите в Pool B (Обозначаване В).
7. Изберете опция за преглед, отпечатване или записване на подредбата на плаките като справка за приготвяне на библиотеки:
  - Изберете иконата  **Print** (Печат) за показване на подредбата на плаката. Изберете **Print** (Печат) за отпечатване на подредбата на плаката.
  - Изберете **Export** (Експортиране) за експортиране на информация за проба към външен файл.
8. Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

### Импортиране на проби

1. Изберете **Import Samples** (Импортиране на проби) и преминете към местоположението на файла с информация за пробата. Има два типа файлове, които може да импортирате.
  - Изберете **Template** (Шаблон) от екрана Create Run (Създаване на изпълняване), за да направите нова подредба на плаките. Файлът с шаблона съдържа правилните заглавия на колони за импортиране. Добавете информация за пробата във всяка колона за всяка проба в изпълняването. Изтрийте примерната информация в неизползвани клетки и след това запишете файла.
  - Използвайте файл с информация за проба, който е бил експортиран от модула за вариант за герминативна линия или за соматичен вариант чрез функцията Export (Експортиране).
2. Изберете иконата  **Print** (Печат) за показване на подредбата на плаката.
3. Изберете **Print** (Печат) за отпечатване на подредбата на плаката като справочна информация за подготовка на библиотеките.
4. Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

## Приготвяне на касетата с реагенти

Не забравяйте да следвате внимателно указанията за касета с реагенти за успешно секвениране.

1. Извадете касетата с реагенти от мястото на съхранение при температура от -25°C до -15°C.
2. Изберете един от долупосочените методи за размразяване на реагентите. Не потапяйте касетата под вода. След размразяването на касетата я подсушете, преди да преминете към следващата стъпка.

Температура	Време за размразяване	Граница на стабилността
От 15°C до 30°C на водна баня	60 минути	Да не се надвишават 6 часа
От 2°C до 8°C	7 часа	Да не се надвишават 5 дни

**ЗАБЕЛЕЖКА** Ако в една и съща водна баня се размразяват повече от една касета, позволете допълнително време за размразяване.

3. Обърнете касетата пет пъти, за да смесите реагентите.
4. Инспектирайте долната част на касетата, за да се уверите, че реагентите са размразени и няма утайки. Потвърдете, че позиции 29, 30, 31 и 32 са размразени, тъй като те са най-големите и отнемат най-дълго време за размразяване.
5. Внимателно почукайте касетата върху масата, за да намалите въздушните мехурчета. За най-добри резултати продължете директно към зареждане на пробата и настройка на изпълняването.

### Подготвяне на поточната клетка

1. Извадете нова кутия с поточна клетка от мястото на съхранение при температура от 2°C до 8°C.
2. Извадете опаковката от фолио от кутията и я оставете настрани на стайна температура за 30 минути.

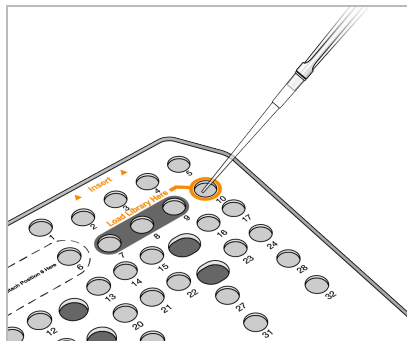
### Приготвяне на библиотеките за секвениране

Денатурирайте и разреждете вашите библиотеки до обем на зареждане от 1,3 ml. Концентрацията на зареждане на практика може да варира в зависимост от методите на приготвяне и количествено определяне на библиотеките. Разреждането на библиотеки с проби зависи от комплексността на олигонуклеотидни обединявания. За указания как да пригответе библиотеки с проби за секвениране, включително разреждане и обединяване на библиотеки, вижте раздела „Инструкции за употреба“ за приложимия комплект за приготвяне на библиотеки. Необходимо е оптимизиране на плътността на клъстерите на NextSeq 550Dx.

### Зареждане на библиотеки в касетата с реагенти

1. Почистете фолиевото запечатване, покриващо резервоар № 10, обозначен с **Load Library Here** (Зареждане на библиотеката тук), посредством кърпа с ниско съдържание на власинки.
2. Пробийте запечатването с чист крайник за пипета от 1 ml.
3. Заредете 1,3 ml от подготвените библиотеки в резервоар № 10, обозначен с **Load Library Here** (Зареждане на библиотеката тук). Избягвайте да докосвате фолиевото запечатване, докато дозирате библиотеките.

Фигура 1 Зареждане на библиотеки



## Конфигуриране на изпълняване на секвениране

Вижте NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочно ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 1000000009513) за пълни инструкции за настройка на изпълняването.

1. Влезте в NextSeq 550Dx с вашата парола за софтуера Local Run Manager или Illumina Run Manager.
2. От екрана Home (Начало) на софтуера NOS изберете **Sequence** (Секвениране).
3. Изберете изпълняване от списъка, след което изберете **Next** (Напред).  
Серия от екрани за настройка на изпълняване се отваря в следния ред: Load Flow Cell (Зареждане на поточната клетка), Load Buffer Cartridge (Зареждане на касета с буфер), Load Reagent Cartridge (Зареждане на касетата с реагент) и Pre-run Check (Проверка преди изпълняване).

**ЗАБЕЛЕЖКА** Изпълняванията са достъпни само с помощта на същия Run Manager, използван при планирането на изпълняването. За инструкции как да настроите софтуера Run Manager, вижте Illumina Run Manager за софтуерно ръководство NextSeq 550Dx (документ № 200025239).

4. Когато се появи екранът Load Flow Cell (Зареждане на поточна клетка), почистете и след това заредете поточната клетка.
  - Извадете поточната клетка от опаковката от фолио.
  - Отворете прозрачната пластмасова опаковка тип „мида“ и извадете поточната клетка.
  - Почистете стъклената повърхност на поточната клетка с кърпичка без власинки със спирт. Подсушете стъклото с лабораторна кърпа с ниско съдържание на власинки
  - Уверете се, че стъклената повърхност на поточната клетка е чиста. Ако е необходимо, повторете стъпката за почистване.
  - Извадете използваната поточна клетка от предходно изпълняване на дейност.
  - Подравнете поточната клетка над щифтовете за подравняване и поставете поточната клетка в станцията.
5. Изберете **Load** (Зареждане).

Вратичката се затваря автоматично, на екрана се появява идентификатора на поточната клетка и сензорите се проверяват.

- Следвайте подканите на софтуера за изпразване на контейнера с изразходвани реагенти, заредете касетата с буфер на NextSeq 550Dx и заредете касетата с реагенти на NextSeq 550Dx. Когато се заредят касетите с буфер и реагенти на NextSeq 550Dx, софтуерът разчита и записва РЧИД. Идентификаторите на касетите с буфер и реагенти се появяват на екрана и се проверяват сензорите.
- Когато автоматичната проверка преди изпълняване на дейност приключи, изберете **Start** (Стартиране). (Не се изисква, ако е конфигурирано да стартира автоматично.)
- Екранът Sequencing (Секвениране) се отваря, когато изпълняването започне. Този екран осигурява визуално представяне на текущото изпълняване, включително интензивност и резултати за качество.

## Резултати

Real-Time Analysis (RTA) е интегриран софтуер, който извършва анализ на изображения и обозначаване на бази и задава резултат за качество на всяка база за всеки цикъл на секвениране. Когато първоначалният анализ приключи, избраният модул за приложение автоматично започва вторичен анализ. Процесите на вторичен анализ, описани тук, са за Local Run Manager Germline and Somatic Variant Modules на Инструмент NextSeq 550Dx.

## Демултиплексиране

Демултиплексирането сравнява всяка последователност от индексни разчитания с индексните последователности, специфични за изпълняването. В тази стъпка не се вземат предвид никакви стойности на качеството.

Индексните разчитания се идентифицират чрез следните стъпки:

- Пробите се номерират, започвайки от 1, в зависимост от последователността, в която са изброени за изпълняването.
- Номер на проба 0 е запазен за клъстери, които не са били зададени в проба.
- Клъстерите се задават към проба, когато индексната последователност съвпада точно или когато има единично несъвпадение на индексно разчитане.

## Генериране на FASTQ файл

След демултиплексиране софтуерът генерира междинни файлове за анализ във формат FASTQ, който е текстов формат, използван за представяне на последователности. FASTQ файловете съдържат разчитания за всяка проба и свързаните с тях резултати за качество. Клъстерите, които не са преминали филтър, са изключени.

Всеки FASTQ файл съдържа разчитания само за една проба и името на тази проба е включено в името на FASTQ файла. В модулите Germline и Somatic Variant се генерират осем файла FASTQ на проба на обединяване за олигонуклеотиди, четири от Read 1 (Разчитане 1) и четири от Read 2 (Разчитане 2). Този резултат води до общо 8 и 16 FASTQ файла на проба за Germline и Somatic, съответно. FASTQ файловете са основната входна информация за подравняване.

## Подравняване

По време на стъпката на подравняване лентовият алгоритъм Smith-Waterman подравнява клъстерите от всяка проба спрямо последователности на ампликони, посочени в манифестните файлове.

Лентовият алгоритъм Smith-Waterman изпълнява полуобстойни подравнявания на последователности за определяне на подобни региони между две последователности. Вместо да сравнява цялата последователност, алгоритъмът Smith-Waterman сравнява сегменти с всички възможни дължини.

Всяко разчитане на сдвоени краища се оценява по отношение на неговото подравняване към съответните последователности на пробата за това разчитане.

- Read 1 (Разчитане 1) се оценява чрез обратно допълнение на локус-специфични олигонуклеотиди след гена (DLSO).
- Read 2 (Разчитане 2) се оценява чрез локус-специфични олигонуклеотиди преди гена (ULSO).
- Ако началото на разчитането съвпада с последователността на пробата с не повече от едно несъвпадение, пълната дължина на разчитането се подравнява спрямо целта на ампликона за тази последователност.
- Ако началото на разчитането съвпада с последователността на пробата с не повече от три разлики (погрешно сдвояване или измествания поради водещи индела), пълната дължина на разчитането се подравнява спрямо целта на ампликона за тази последователност.
- Инделите в рамките на DLSO и ULSO не се наблюдават, като се вземе предвид аналитичната химия.

Подравняванията се филтрират от резултатите от подравняването въз основа на проценти на погрешно сдвояване или в региона на интерес, или в пълния ампликон в зависимост от дължината на ампликона. Филтрираните подравнявания се записват във файловете за подравняване като неподравнени и не се използват при обозначаване на варианти.

## Обозначаване на вариант

Инструментът за обозначаване на вариант (Pisces) е проектиран да прави обозначавания за варианти на SNV и индели от библиотеките, приготвени за инструмента.

## Отчети и допълнителни изходни файлове

Модулите за анализ на варианти създават отчети в PDF и разделени с табулации (\*.txt) отчети, които показват показатели, като например дълбочина на секвениране и брой варианти. Модулите също така генерират изходни файлове, като например VCF файлове и файлове с формат на обозначаване на

геномен вариант (gVCF), за приложения с обозначаване на вариантите.

## Процедури за качествен контрол

Софтуерът NextSeq 550Dx оценява всяко изпълняване, проба и обозначаване на бази спрямо измерванията за контрол на качеството. Положителните и отрицателните контроли също се препоръчват при приготвянето на библиотеката и е необходимо да бъдат оценени. Оценете контролите, както следва:

- **Отрицателна контрола (без контрол на шаблона) или друга отрицателна контрола** – трябва да генерира очаквания резултат. Ако отрицателната контрола генерира резултат, различен от очаквания, тогава е възникнала възможна грешка в проследяването на проби, неправилен запис на индексирани праймери или замърсяване.
- **Положителната контролна проба** – трябва да генерира очаквания резултат. Ако положителната контрола генерира резултат, различен от очаквания, тогава е възникнала възможна грешка в проследяването на проби или неправилен запис на индексирани праймери.

## Функционални характеристики

Характеристиките на производителността за Инструмент NextSeq 550Dx са установени с помощта на модулите Germline и Somatic Variant Module с TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и са потвърдени с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Проучванията включваха индексирани проба, пренасяне на проба, входен ДНК материал, аналитична чувствителност (граница на празна проба/граница на откриване), точност, прецизност, сравняване на метод и възпроизводимост.

Аналитичните проучвания, използващи NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла), бяха проектирани да оценят твърденията за производителността, установени по-рано с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла). Резултатите демонстрират, че комплектите с реагенти (v2 и v2.5) имат сравнима производителност при използването на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Вижте *листовката в опаковката на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* за характеристики на производителността, свързани с фактори преди анализа, като например методи за екстракция или смущаващи процеса вещества.

## Определения на изчисленията, използвани в характеристиките на производителността

1. Положителното процентно съответствие (PPA) се изчислява като дела на локусите, класифицирани като варианти чрез референтен метод, които са отчетени правилно от анализа.
  - $(\text{брой локуси на варианти, правилно отчетени от анализа}) / (\text{общ брой локуси на варианти})$



Локуси на варианти, докладвани от анализа, които съответстват на референтния метод, са действително положителни резултати (TP). Локуси на варианти, отчетени като референтни обозначавания или като различни обозначавания на варианти от анализа, са фалшиво отрицателни (FN).

- Отрицателното процентно съответствие (PPA) се изчислява като дела на локусите, класифицирани като див тип чрез референтен метод, които са отчетени правилно от анализа.
  - $$\frac{\text{(брой локуси от див тип, правилно отчетени от анализа)}}{\text{(общ брой локуси от див тип)}}$$
Локусите от див тип, отчетени от анализа, които съответстват на референтния метод, са действително отрицателни резултати (TN). Локусите от див тип, отчетени като варианти от анализа, са фалшиво положителни (FP).
- Общото процентно съответствие (OPA) се изчислява като делът на локусите, правилно отчетени от анализа спрямо референтен метод.
  - $$\frac{\text{(брой локуси на варианти, правилно отчетени от анализа)} + \text{(брой локуси от див тип, правилно отчетени от анализа)}}{\text{(общ брой локуси на вариант)} + \text{(общ брой на локуси от див тип)}}$$
- Изчисленията на PPA, NPA и OPA не включват състоянията без обозначавания (локуси на вариант или референтни локуси, които не отговарят на един или повече филтри за качество).
- Честотата на автозомните обозначавания се изчислява като общ брой локуси, преминаващи филтрите, разделен на общия брой позиции, секвенирани за хромозоми 1 – 22; хромозомите X и Y са изключени. Това измерване не отчита съответствието на обозначаванията с референтния метод.

## Производителност на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла)

### Индексирание на проби

Индексните праймери на пробата, добавени по време на приготвянето на библиотеката, задават уникална последователност за всяка проба ДНК. Тази уникална последователност позволява множество проби да бъдат пулирани заедно в единично изпълняване на секвениране. Индексиранието на проби се използва в работни процеси както за герминативна линия, така и за соматични варианти. Целта на това проучване беше да установи минималния (8) и максималния (96) брой проби, които могат да бъдат обработени в единично изпълняване на секвениране от Инструмент NextSeq 550Dx. Бяха тествани осем уникални проби Platinum Genome с 12 различни комбинации за индексирани праймери на проба. Резултатите за пробите от четири изпълнявания на секвениране с помощта на Germline Variant Module бяха сравнени с Platinum Genome версия 2016-1.0.

За първия набор от изпълнявания бяха тествани 96 уникално индексирани библиотеки с проби чрез представителен анализ, предназначен да сравни различни гени, обхващащи 12 588 бази на верига във всичките 23 човешки хромозоми, за да се провери способността на анализа да направи генотипизиращо

обозначаване последователно за дадена проба сред различни комбинации на индексирани праймери. За втория набор от изпълнявания осем уникално индексирани библиотеки с проби бяха секвенирани в две изпълнявания на секвениране, за да се провери минималният брой на поддържани индекси.

За 96-индексните изпълнявания PPA за SNV варираше от 98,7% до 100%, PPA за инсерции и делеции беше 100% и NPA беше 100% за всяка от 96-те индексни комбинации. 8-индексните изпълнявания имаха PPA стойност от 100% (SNV, инсерции и делеции) и NPA от 100% за всяка от осемте индексни комбинации.

### Пренасяне на проба

Инструментът NextSeq 550Dx позволява секвениране на множество проби плюс контроли в единично изпълняване на секвениране. Беше проведено проучване, за да се оцени обхватът на пренасяне на проба в рамките на изпълняване на секвениране (в рамките на изпълняване) и между изпълнявания на секвениране (изпълняване до изпълняване). Тествани са две проби Platinum Genome – една мъжка и една женска – с представителен анализ, проектиран за изследване на разнообразни гени, покриващ 12 588 бази (150 ампликона) сред 23 различни хромозоми, включително хромозоми на двата пола. Библиотеките бяха секвенирани в инструмента NextSeq 550Dx с помощта на Germline Variant Module. Пренасянето на мъжки проби в женски проби беше наблюдавано чрез наличието на разчитания на ампликони с Y хромозоми в женски проби.

Пренасянето в рамките на изпълняването може да бъде започнато по време на генерирането на клъстери, обозначаването на бази в индекс цикъл и демултиплексирането на проби. За да се тества пренасянето на проба в рамките на изпълняване на секвениране, библиотечно обединяване, съдържащо 46 репликата – всеки от мъжки и женски проби, плюс четири контроли без шаблон, беше секвенирано веднъж в инструмента NextSeq 550Dx. Пренасянето на проба в рамките на изпълняване беше оценено чрез сравнение на покритието на ампликон с Y хромозома на всеки женски репликат спрямо средното покритие на ампликон с Y хромозома на всички мъжки репликати в обединяването. Средното пренасяне, наблюдавано в рамките на изпълняването, беше 0,084%.

За да се тества пренасянето на проба от изпълняване към изпълняване, две библиотечни обединявания бяха приготвени и секвенирани последователно в инструмента NextSeq 550Dx. Първото обединяване съдържащо 46 репликата на женска проба плюс две контроли без шаблон. Второто обединяване съдържащо 46 репликата на мъжка проба плюс две контроли без шаблон. И двете обединявания използваха един и същи набор от индексни адаптери. Женското обединяване беше секвенирано първо, последвано от друго изпълняване на секвениране с мъжкото обединяване, последвано от още едно повторение на изпълняване на секвениране на женското обединяване. Пренасянето на проба от изпълняване към изпълняване беше оценено чрез сравнение на покритието на ампликона с Y хромозома между съответстващи репликати на повторното изпълняване на женското обединяване и изпълняването на мъжкото обединяване. Средното пренасяне, наблюдавано от изпълняване към изпълняване, беше 0,0076%

### Входен ДНК материал

#### Кръв (герминативна линия)

Установен е диапазонът на входния кръвен ДНК материал за приготвянето на библиотеката на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx с помощта на работния процес на Germline Variant Module за Инструмент NextSeq 550Dx. Този диапазон е оценен чрез изпълнение на проучване чрез серия разреждания с 13 проби Platinum Genome с представителен анализ, проектиран да изследва различни гени, покривайки 12 588 бази сред 23 различни хромозоми. Библиотеката беше секвенирана на два инструмента NextSeq 550Dx с помощта на една партида NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла).

Пет проби са тествани в дупликация при пет нива на входен ДНК материал в диапазон от 250 ng до 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng и 12 ng). Осем проби са тествани като самостоятелен репликат във всяко от петте нива на входен ДНК материал. За определяне на точността генотипове от пробите са сравнени с Platinum Genome версия 2016-1.0. Резултатите са определени за всяко входно ниво. PPA за всеки тип вариант (SNV, инсерции и делеции) е представено в [Таблица 1](#); NPA е представено в [Таблица 2](#). Всички нива на входни материали имат сходна точност. Препоръчителният входен ДНК материал за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx е 50 ng с 25 ng и 100 ng, предоставяйки долна и горна граница за отговаряне на характеристиките на производителността.

Таблица 1 Резултати за PPA за всеки входен ДНК материал по тип вариант

Входен ДНК материал (ng)	Тип вариант	Очаквани варианти	TP	FN	Вариант без обозначавания	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	Инсерция	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	Делеция	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

Таблица 2 NPA за всеки входен ДНК материал

Входен ДНК материал (ng)	TN	FP	Референция без обозначавания	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 (Соматичен)

Установен е диапазонът на входния фиксиран с формалин и вграден в парафин ДНК материал за приготвянето на библиотеката на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx с помощта на работния процес за Somatic Variant Module за инструмента NextSeq 550Dx. Диапазонът на входния ДНК материал е оценен чрез изпълнение на проучване чрез серия разреждания с три проби Platinum Genome с представителен анализ, проектиран да изследва различни гени, покривайки 12 588 бази сред 23 различни хромозоми. Клетъчните линии GM12878 и GM12877 на Platinum Genome бяха фиксирани с формалин и вградени в парафин и след това беше извлечена ДНК. GM12878 беше разреждана с GM12877, така че честотите на алелните варианти (VAF) на 79 варианта (55 еднонуклеотидни варианта, 9 инсерции и 15 делеции) бяха близо 0,025, 0,05 или 0,10. Освен това всяка проба имаше 91 варианта с по-високи честоти на варианта със стойности до 1,0 VAF. Пробите бяха обработени в дубликация на пет нива на входен ДНК материал със среден делта количествен цикъл (dCq) от 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 и 7,8 – както е измерено от TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit. Всяка библиотека беше секвенирана на два инструмента NextSeq 550Dx с помощта на две партиди NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла). За определяне на точността на обозначаванията на варианти от пробите са сравнени с Platinum Genome версия 2016-1.0. PPA за всеки тип вариант (SNV, инсерции и делеции) е представено в [Таблица 3](#); NPA е представено в [Таблица 4](#). Препоръчителният входен ДНК материал за варианти при или над 0,05 VAF е dCq ≤ 4 с 4,6, предоставяйки долна граница за отговаряне на характеристиките на производителността.

Таблица 3 Резултати за PPA за всеки входен ДНК материал по тип вариант

Средна стойност на dCq	Тип вариант	Очаквани варианти	Очаквани без обозначавания	Целева VAF на разреждане					
				0,025		0,05		0,10	
				Вариант без обозначавания	PPA (%)	Вариант без обозначавания	PPA (%)	Вариант без обозначавания	PPA (%)
2,1	SNV	808	Не е приложимо.	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	Инсерция	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	Делеция	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

Таблица 4 NPA за всеки входен ДНК материал

Средна стойност на dCq	Очакван див тип	Целева VAF на разреждане					
		0,025		0,05		0,10	
		Референция без обозначавания	NPA (%)	Референция без обозначавания	NPA (%)	Референция без обозначавания	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

## Аналитична чувствителност (граница на празна проба [LoB] и граница на откриване [LoD])

Проучването беше проведено, за да се оцени границата на празна проба (LoB) и границата на откриване (LoD) за Somatic Variant Module в инструмента NextSeq 550Dx. Това беше изпълнено с помощта на представителен анализ, проектиран за изследване на разнообразни гени, покриващи 12 588 бази сред 23 различни хромозоми. Клетъчните линии GM12878 и GM12877 на Platinum Genome бяха фиксирани с формалин и вградени в парафин и след това беше извлечена ДНК. GM12878 беше разредена с GM12877, така че честотите на вариантите на 74 варианта (53 еднонуклеотидни варианта, 7 инсерции и 14 делеции) бяха  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 и разредената GM12878 (GM12878-D) бяха тествани в шест последователни начални дни с един инструмент с редуване между две партии NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) за общо шест изпълнявания на секвениране. Този тест доведе до 60 репликацията за всеки вариант в GM12878-D и 72 репликацията за всяка съответстваща координата от див тип в GM12877 за всяка партида реагенти. LoB и LoD бяха изчислени чрез класически подход, посочен в CLSI EP17-A2 чрез непараметрична опция. LoB и LoD бяха изчислени за еднонуклеотидни варианти, инсерции и делеции отделно чрез обединяване на вариантите честоти за даден тип вариант. Грешка тип I е определена като 0,01, а грешка тип II е определена като 0,05.

За LoB обединените вариантни честоти бяха сортирани от най-ниска към най-висока и беше изчислена 99-тата ранкова позиция за всяка партида реагенти за всеки тип вариант (Таблица 5). Somatic Variant Module използва гранична стойност (ефективната LoB) от 0,026 VAF за определяне на качествено откриване на варианти. Изчислените LoB потвърдиха, че тази гранична стойност води до грешка тип I от не повече от 0,01.

Таблица 5 Граница на празна проба

Тип вариант	Общо наблюдения	LoB за партида с реагент 1 (%)	LoB за партида с реагент 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Инсерция	504	0,56	0,56
Делеция	1008	1,20	1,20

За LoD беше калкулиран процентът на честота на индивидуални мутации за всяка партида с реагенти за всеки тип вариант, попадащ под граничната стойност от 0,026 Таблица 6. Тъй като процентите бяха помалки, отколкото при грешка тип II от 5% (0,05), медианата на честотите на комбинираните варианти е изчислена като LoD (Таблица 6). Взета е стойността на LoD за всеки тип вариант като по-голямата от двете изчислени стойности за двете партии с реагенти – 4,97% за еднонуклеотидни варианти (SNV), 5,12% за инсерции и 5,26% за делеции.

Таблица 6 Граница на откриване

Партида с реагенти	Тип вариант	Общо наблюдения	Брой измервания на VAF < 2,6%	% измервания на VAF < 2,6%	Граница на откриване (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Инсерция	420	6	1,4	5,08
	Делеция	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Инсерция	420	5	1,2	5,12
	Делеция	840	7	0,80	5,26

## Точност

### Герминативна линия

Проучването по-долу бе проведено, за да се оцени точността на обозначаването на вариант от Germline Variant Module в Инструмент NextSeq 550Dx с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла). 13 уникални проби Platinum Genome бяха тествани с помощта на представителен анализ на изследване на разнообразие от гени, обхващащ 12 588 бази (150 ампликона) сред 23 различни хромозоми. Извършени са общо девет изпълнявания с помощта на три инструмента за секвениране, три партиди реагенти и трима оператори в пет начални дни. Точността за SNV, инсерциите и делециите беше определена чрез сравняване на резултатите с добре характеризирани съставен референтен метод – Platinum Genome версия 2016-1.0. Въз основа на този референтен метод бяха дефинирани доверителни геномни региони, освен ако не е посочено друго.

Таблица 7 Обобщение на съответствието на герминативната линия

Критерии	Общо наблюдения <sup>1</sup>	Резултат от наблюдение <sup>2</sup>	Резултат от изпълняване <sup>3</sup>
PPA за SNV	819	98,7	>99,9
PPA за инсерции	819	95,0	98,9
PPA за делеции	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Изчислени като брой проби на изпълняване (91) x брой изпълнявания (9) = 819.

<sup>2</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред всички 9 изпълнявания.

<sup>3</sup>Най-ниска стойност, когато данните от всяко изпълняване са анализирани сборно.

Таблица 8 съдържа данните от изследването, представени с положително и отрицателно процентно съответствие на база на проба, където резултатите от вариантите се сравняват с Platinum Genome версия 2016-1.0 за изчисления на PPA. Трите типа варианти (SNV, инсерции и делеции) са комбинирани. Тъй като референтният метод предоставя резултати само за еднонуклеотидни варианти и инсерции/делеции, невариантните резултати за бази се сравняват с модела на човешка геномна референтна секвенция hg19 за изчисления на NPA.

Таблица 8 Съответствие на герминативната линия за проба

Проба	Средна честота на обозначаване	Очаквани варианти <sup>1</sup>	TP	FN	Вариант без обозначаване	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

<sup>1</sup> Общ брой варианти във всички репликати на проби сред 9 изпълнявания.

Таблица 9 съдържа данните от изследването, представени на база за проба, където резултатите от вариантите се сравняват с добре характеризирания съставен референтен метод. Откриването се оценява за всеки тип вариант – еднонуклеотидни варианти, инсерции и делеции – поотделно. Референтните позиции са изключени.

Таблица 9 Съответствие на герминативната линия за проба по тип вариант

Проба	SNV			Инсерции			Делеции		
	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0



Проба	SNV			Инсерции			Делеции		
	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN
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

Пробите бяха допълнително анализирани за обозначаване на малки инсерции и делеции (индели). Цялостно обобщение е представено в Таблица 10. Има общо 71 индели, вариращи по размер от 1 – 24 bp за инсерции и 1 – 25 bp за делеции.

Таблица 10 Обобщение на откриването на индели на герминативната линия

Вариант Тип	Очаквани варианти	TP	FN	Вариант без обозначавания	PPA
Инсерция	18522	18018	27	477	99,9
Делеция	17388	17073	0	315	100

Представителният анализ се състоеше от 150 ампликона, предназначени да покрият разнообразно геномно съдържание. Съдържанието на гуанин-цитозин (GC) на ампликоните варира от 0,19 – 0,87. Ампликоните също имат обхват от еднонуклеотидни (напр. ПолиА, ПолиТ), динуклеотидни и тринуклеотидни повторения. Данните бяха събрани на база ампликон (Таблица 11), за да се определи ефектът на геномното съдържание върху процент правилни обозначавания. Процентът правилни обозначавания се състои от обозначавания на вариант и референции и е по-малък от 100%, ако са налични неправилни или никакви обозначавания.

Таблица 11 Точност на ниво ампликон при герминативната линия

Ампликон	Хромозома	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), индел	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	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), индел	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), СТ (3), ТAA(3), индел	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Не е приложимо	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), индел	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), индел	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Индел	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), индел	0,42	59787	0	0	100
17	3	44662229	4466321	93	93	AT(3), индел	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	He e приложимо	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индел	0,49	57330	0	0	100
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	Индел	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	He e приложимо	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), индел	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), индел	0,27	50778	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
28	5	1882081	1882158	78	75	He e приложимо	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	He e приложимо	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), индел	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	Индел	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	Индел	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	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	Индел	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), индел	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	He e приложимо	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	72072	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), индел	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), индел	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Не е приложимо	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Не е приложимо	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), индел	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	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	Индел	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Не е приложимо	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), индел	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), индел	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Индел	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	He e приложимо	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	He e приложимо	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	He e приложимо	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	He e приложимо	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	He e приложимо	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	He e приложимо	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	Индел	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), индел	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), индел	0,52	68796	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Не е приложимо	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	Не е приложимо	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), индел	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	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	Не е приложимо	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), индел	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	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	Индел	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	Индел	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), индел	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	Индел	0,65	58149	0	0	100

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
99	15	89817413	89817503	91	91	He e приложимо	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	He e приложимо	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), индел	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), индел	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	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), индел (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), индел	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	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	He e приложимо	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	56511	0	0	100



Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), индел	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	He e приложимо	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	He e приложимо	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	He e приложимо	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	He e приложимо	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	He e приложимо	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	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	Индел	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	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), индел	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), индел	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Не е приложимо	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Не е приложимо	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	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	Не е приложимо	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	Не е приложимо
149	Y	2655519	2655609	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	Не е приложимо
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Не е приложимо

Резултатите от секвенирането за проба NA12878 бяха сравнени с високо доверителния генотип за NA12878, установен от Националните институти за стандарти и технологии (NIST) (v.2.19). От 150 ампликона 92 ампликона се съдържаха изцяло във високо доверителните геномни региони, 41 ампликона имаха частично припокриване и 17 ампликона нямаша припокриване в секвенцията на NIST. Този резултат доведе до 10 000 координати на репликат за сравнение. Невариантни обозначавания на бази бяха сравнени с модел на човешка геномна референтна секвенция hg19. Резултатите за точността са показани в Таблица 12.

Таблица 12 Съответствие на герминативната линия на проба NA12878 с база данни на NIST

Проба	Брой ампликони	Средна честота на обозначаване	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Въз основа на данните, предоставени от това проучване на герминативната линия от девет изпълнявания, инструментът Инструмент NextSeq 550Dx може последователно да секвенира:

- Съдържание на гуанин-цитозин (GC)  $\geq 19\%$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 19%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,6%)
- Съдържание на гуанин-цитозин  $\leq 87\%$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 87%, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)
- PolyA дължини  $\leq 9$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyA от девет нуклеотида, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)
- PolyT дължини  $\leq 10$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyT от десет нуклеотида, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)
- PolyG дължини  $\leq 7$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyG от седем нуклеотида, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 1,0%)
- PolyC дължини  $\leq 6$  (всички обозначени бази в 2457 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyC от шест нуклеотида, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)
- Дължини на динуклеотидно повторение  $\leq 11x$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи динуклеотидно повторение 11x, бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,5%)

- Дължини на тринуклеотидно повторение  $\leq 5x$  (всички обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи тринуклеотидно повторение 5x, бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,5%)
- Дължини на инсерция  $\leq 24$  (66 343 от 66 370 обозначени бази в 819 секвенирани ампликона, съдържащи 24-нуклеотидна инсерция, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 1,2%; не се появиха неправилни обозначавания в регион, съдържащ 24-нуклеотидна инсерция)
- Дължини на делеции  $\leq 25$  (всички обозначени бази в 2457 секвенирани ампликона, съдържащи 25-нуклеотидна делеция, обозначени правилно с нула състояния без обозначавания)

## Соматичен

Проучването, описано тук, беше използвано, за да се оцени точността на обозначаването на вариант на Somatic Variant Module в Инструмент NextSeq 550Dx с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла).

Това проучване използва дизайн на представителен анализ за изследване на разнообразие от гени, покриващи 12 588 бази (150 ампликона) сред 23 различни хромозоми. ДНК на Platinum Genome беше извлечена от FFPE третирани блокове, за да се генерират шест уникални проби за оценка в проучването.

ДНК на проба GM12877 беше разреждана с ДНК на проба GM12878, за да се създадат GM12877-D5 и GM12877-D7 като набор от уникални хетерозиготни варианти с честота на варианта близо 5% и 7%. ДНК на проба GM12878 беше разреждана по подобен начин с ДНК на проба GM12877, за да се създадат GM12878-D5 и GM12878-D7. Всяка от пробите беше тествана в трипликат, освен разредените проби, които бяха тествани в репликати от шест. Извършени са общо девет изпълнявания с помощта на три инструмента за секвениране, три партиди реагенти и трима оператори в пет начални дни. Точността за SNV, инсерциите и делециите беше определена чрез сравняване на резултатите с добре характеризирания съставен референтен метод – Platinum Genome версия 2016-1.0. Въз основа на този референтен метод бяха дефинирани доверителни геномни региони, освен ако не е посочено друго.

Таблица 13 Обобщение на соматичното съответствие

Критерии	Общо наблюдения <sup>1</sup>	Резултат от наблюдение <sup>2</sup>	Резултат от изпълняване <sup>3</sup>
PPA за SNV	378	98,9	99,9
PPA за инсерции	378	96,9	99,9
PPA за делеции	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Изчислени като брой проби на изпълняване (42) x брой изпълнявания (9) = 378.

<sup>2</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред всички 9 изпълнявания.

<sup>3</sup>Най-ниска стойност, когато данните от всяко изпълняване са анализирани сборно.

Таблица 14 съдържа данните от изследването, представени с положително и отрицателно процентно съответствие на база за проба, където резултатите от вариантите се сравняват с добре характеризирания съставен референтен метод за изчисления на PPA. Трите типа варианти (SNV, инсерции и делеции) са комбинирани. Тъй като референтният метод предоставя резултати само за еднуклеотидни варианти и инсерции/делеции, невариантните резултати за бази се сравняват с модела на човешка геномна референтна секвенция hg19 за изчисления на NPA.

Таблица 14 Соматично съответствие за проба

Проба	Средна честота на обозначаване	Очаквани	TP	FN	Вариант без обозначаваня	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

Таблица 15 съдържа данните от изследването, представени на база за проба, където резултатите от вариантите се сравняват с добре характеризирания съставен референтен метод. Откриването се оценява за всеки тип вариант – еднуклеотидни варианти, инсерции и делеции – поотделно. Референтните позиции са изключени.

Таблица 15 Соматично съответствие за проба по тип вариант

Проба	SNV			Инсерции			Делеции		
	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0

Проба	SNV			Инсерции			Делеции		
	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN	Очаквани	TP	FN
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

Десетте проби бяха допълнително анализирани за обозначаване на малки инсерции и делеции (индели) (Таблица 16). Има общо 71 индели, вариращи по размер от 1 – 24 bp за инсерции и 1 – 25 bp за делеции.

Таблица 16 Обобщение на откриването на индели на соматичния вариант

Тип вариант	Очаквани варианти	TP	FN	Вариант без обозначавания	PPA
Инсерция	10773	10282	9	482	99,2
Делеция	11502	10667	5	830	>99,9

150-те ампликона са предназначени да покрият разнообразно геномно съдържание. Съдържанието на гуанин-цитозин (GC) на ампликоните варира от 0,19 – 0,87%. Ампликоните също имат обхват от еднонуклеотидни (напр. PolyA, PolyT), динуклеотидни и тринуклеотидни повторения. Данните бяха събрани на база ампликон (Таблица 17), за да се определи ефектът на геномното съдържание върху процент правилни обозначавания. Процентът правилни обозначавания се състои от обозначавания на вариант и референции и е по-малък от 100%, ако са налични неправилни или никакви обозначавания.

Таблица 17 Точност на ниво ампликон при соматичния вариант

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
1	1	36450499	36450591	93	93	Индел	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), индел	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Индел	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Индел	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), индел	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), индел	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Индел	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Индел	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Не е приложимо	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), индел	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), индел	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	He e приложимо	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), индел	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	44662229	4466321	93	93	AT(3), индел	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	He e приложимо	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индел	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	Индел	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	He e приложимо	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), индел	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), индел	0,27	22944	0	560	97,6



Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
28	5	1882081	1882158	78	75	He e приложимо	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	He e приложимо	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), индел	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	Индел	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	Индел	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индел	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	Индел	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), индел	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	He e приложимо	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Индел	0,35	33060	0	213	99,4

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Индел	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), индел	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), индел	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Не е приложимо	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Индел	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Не е приложимо	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), индел	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Индел	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	Индел	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Не е приложимо	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), индел	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), индел	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
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	Индел	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индел	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	He e приложимо	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	He e приложимо	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	He e приложимо	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Индел	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	He e приложимо	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Индел	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	He e приложимо	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	He e приложимо	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Индел	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), индел	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), индел	0,52	31645	16	525	98,3

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Не е приложимо	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	Не е приложимо	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), индел	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Индел	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Индел	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	Не е приложимо	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), индел	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Индел	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Индел	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	Индел	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	Индел	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), индел	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	Индел	0,65	26762	0	76	99,7

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
99	15	89817413	89817503	91	91	Не е приложимо	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Индел	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Не е приложимо	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), индел	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), индел	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Индел	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Индел	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), индел (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), индел	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Индел	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Не е приложимо	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), индел	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	СТС(3), индел	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	СТ(3), индел	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Не е приложимо	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Не е приложимо	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Не е приложимо	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Не е приложимо	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Не е приложимо	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	АС(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	СТ(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), индел	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Индел	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Индел	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	Индел	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Индел	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индел	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), индел	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

Ампликон	Хромозом	Начало на ампликон	Край на ампликон	Размер на анализирания фрагмент	Бази в доверителни региони	Геномно съдържание на ампликон	Съдържание на гуанин-цитозин	Правилни обозначавания	Неправилни обозначавания	Без обозначавания	% правилни обозначавания
140	22	25750774	25750873	100	100	Индел	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Не е приложимо	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Индел	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Не е приложимо	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Индел	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	Не е приложимо	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Не е приложимо	0,55	0	0	0	NA
149	Y	2655519	2655609	91	0	Не е приложимо	0,48	0	0	0	NA
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	NA

Резултатите от секвенирането за проба GM12878 бяха сравнени с високо доверителния генотип за NA12878, установен от Националните институти за стандарти и технологии (NIST) (v.2.19). От 150 ампликона 92 ампликона се съдържаха изцяло във високо доверителните геномни региони, 41 ампликона имаха частично припокриване и 17 ампликона нямаша припокриване в секвенцията на NIST. Този резултат доведе до 10 000 координати на репликат за сравнение. Невариантни обозначавания на бази бяха сравнени с модел на човешка геномна референтна секвенция hg19. Резултатите за точността са показани в [Таблица 18](#).

Таблица 18 Соматично съответствие на проба GM12878 с база данни на NIST

Проба	Брой ампликони	Средна честота на обозначаване	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Въз основа на данните, предоставени от това проучване на соматичния вариант от девет изпълнявания, Инструмент NextSeq 550Dx може последователно да секвенира:

- Съдържание на гуанин-цитозин (GC)  $\geq 19\%$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 19%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 2,6%)
- Съдържание на гуанин-цитозин  $\geq 87\%$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона със съдържание на гуанин-цитозин 87%, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,6%)
- PolyA дължини  $\leq 9$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyA от девет нуклеотида, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 2,5%)
- PolyT дължини  $\leq 10$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyT от десет нуклеотида, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,1%)
- PolyG дължини  $\leq 6$  (всички обозначени бази в 2268 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyG от шест нуклеотида, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,5%)
- PolyC дължини  $\leq 6$  (всички обозначени бази в 756 секвенирани ампликона, съдържащи повторение на PolyC от шест нуклеотида, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,4%)
- Дължини на динуклеотидно повторение  $\leq 4x$  (всички обозначени бази в 1890 секвенирани ампликона, съдържащи динуклеотидно повторение 4x, бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 0,9%)
- Дължини на тринуклеотидно повторение  $\leq 5x$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона, съдържащи тринуклеотидно повторение 5x, бяха обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания от 1,4%)



- Дължини на инсерции  $\leq 23$  (всички обозначени бази в 378 секвенирани ампликона, съдържащи 23-нуклеотидна инсерция, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,8%)
- Дължини на делеции  $\leq 25$  (всички обозначени бази в 1134 секвенирани ампликона, съдържащи 25-нуклеотидна делеция, обозначени правилно с честота на състояния без обозначавания 0,7%)

## Прецизност

Прецизността на Инструмент NextSeq 550Dx беше определена чрез тестване на 13 уникални проби Platinum Genome с помощта на три инструмента, три партиди реагенти и трима оператори, за да се генерират девет изпълнявания на секвениране в пет начални дни. Представителният анализ, пробите и референтният метод са същите, както са описани за проучването на точността на герминативната линия. Приносът на прецизността беше определен чрез дисперсионен анализ на компонент с помощта на VAF като променлива на отговора и чрез изчисляване на стандартните отклонения на ниво компонент за инструмента, партидата реагент, оператора и началния ден ([Таблица 19](#)). Общият брой наблюдения, използван в анализа за вариабилността на всеки компонент на инструмент, оператор или партида реагент, беше 699, 176 и 235 съответно за SNV, инсерции и делеции.

Таблица 19 Резултати за прецизността за инструмента NextSeq 550Dx (стандартно отклонение)

Компонент	Тип вариант	Стандартно отклонение на компонента		Общо стандартно отклонение	
		Макс.	Медиана	Макс.	Медиана
Партида	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Инсерция	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Делеция	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Инструмент	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Инсерция	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Делеция	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Оператор	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Инсерция	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Делеция	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Ден	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Инсерция	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Делеция	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

## Сравняване на методи (платформа за секвениране)

Проби с цяла кръв и FFPE проби бяха оценени в инструмента Инструмент NextSeq 550Dx и инструмента MiSeqDx с помощта на работните процеси за герминативна линия и за соматичен вариант на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Съответствието на честотата на варианта за проби с цяла кръв и FFPE проби беше оценено с помощта на няколко представителни анализа. [Фигура 2](#) представя корелацията на VAF между двата инструмента за един представителен анализ, а [Таблица 20](#) обобщава тази корелация чрез аналитичен панел. Въз основа на силната корелация между инструмента MiSeqDx и инструмента Инструмент NextSeq 550Dx характеристиките на производителността, свързани с фактори преди анализа (например методи за екстракция или смущаващи процеса вещества), са определени като приложими за двата инструмента. Вижте листовката за TruSeq Custom Amplicon Kit Dx за допълнителни подробности.

Фигура 2 Корелация на VAF на инструмента MiSeqDx спрямо NextSeq 550Dx за FFPE (лява) и кръвна (дясна) проба с анализ 1

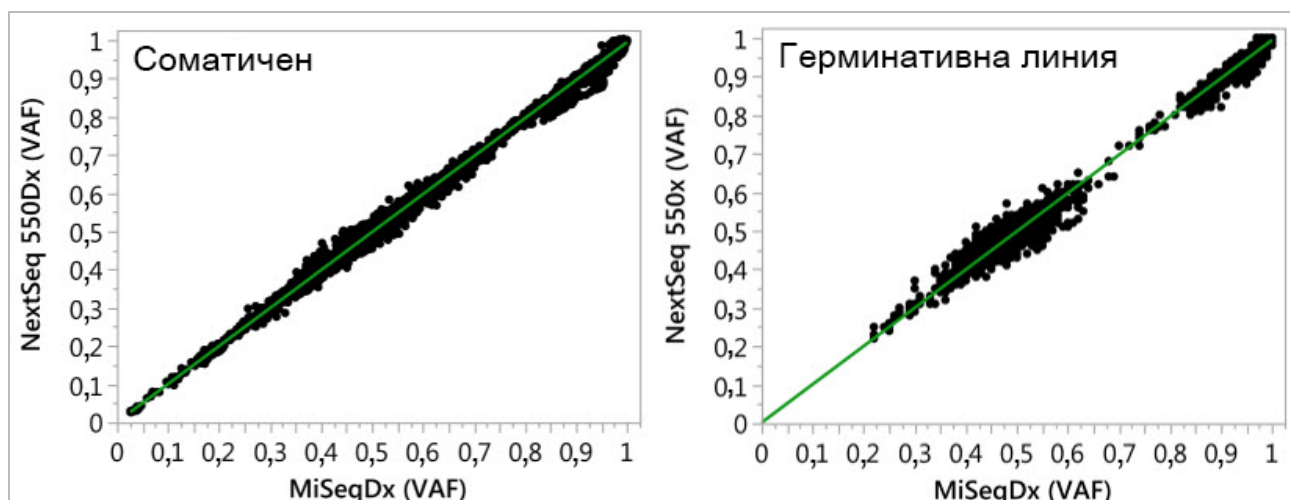


Таблица 20 Резултати от сравняване на методи чрез уникални кръвни и FFPE проби

Източник на геномна ДНК	Анализ (олигонуклеотиден панел)	Биологични репликати (проби)	Технически репликати (за проба)	Наблюдения (бр. варианти)	Наклон	Припокриване	Корелация ( $R^2$ )
Кръв	Анализ 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Кръв	Анализ 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Анализ 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Анализ 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Две точки на данни бяха премахнати въз основа на посоченото ограничение за Germline Variant Module.

<sup>2</sup>Коефициент на определяне за графиките на VAF, както е илюстрирано на Фигура 2.

## Възпроизводимост

Възпроизводимостта на Инструмент NextSeq 550Dx беше оценена с помощта на проби Platinum Genome с представителен анализ, проектиран за изследване на разнообразие от гени, покриващи 12 588 бази сред 23 различни хромозоми чрез 150 ампликона. Тестването на герминативната линия се състоеше от седем репликата на 13 проби; соматичното тестване се състоеше от шест репликата на седем проби на различни нива на VAF. Пробите бяха подготвени с TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Тестването е извършено в три външни центъра с една партида NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла). Един-единствен инструмент NextSeq 550Dx беше използван във всеки център. Двама оператори проведоха тестването във всеки център. Всеки оператор извърши тестване в три непоследователни начални дни за всеки вид проба за общо 36 изпълнявания в трите центъра. Това тестване доведе до 18 изпълнявания за всеки работен процес на герминативна линия и на соматичен вариант.

## Герминативна линия

Варианти за герминативна линия с нива на VAF  $\geq 0,2$  се докладват като положителни (вариант). За очаквани положителни варианти за герминативна линия данните бяха оценени за честота на състояния без обозначавания и честота на състояния с положително обозначаване в рамките на всеки тип вариант (SNV, инсерция, делеция). Таблица 21 обобщава наблюдаваните честоти заедно с долните и горните доверителни нива от 95% (LCL/UCL), изчислени чрез метода за оценка на Уилсън за всеки тип вариант.

Таблица 21 Наблюдения на обозначаването на герминативната линия за очакваните положителни резултати по тип вариант

Тип вариант	Без обозначаване			Правилно положително обозначаване				
	Наблюдавани	Общо	Процент	Наблюдавани	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Инсерции	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Делеции	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Варианти за герминативна линия с нива на VAF  $< 0,2$  се докладват като отрицателни (див вид). За очаквани отрицателни местоположения на герминативната линия данните бяха оценени за честота на състояние без обозначаване и честота на състояние правилно обозначаване от див тип. Таблица 22 обобщава наблюдаваните честоти заедно с долните и горните доверителни нива от 95% (LCL/UCL), изчислени чрез метода за оценка на Уилсън.

Таблица 22 Наблюдения на обозначаването на герминативната линия за очакваните отрицателни резултати

Тип вариант	Без обозначаване			Правилно отрицателно обозначаване				
	Наблюдавани	Общо	Процент	Наблюдавани	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
Див тип	4883	19 600	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00
		182			299			

Вариантите за герминативната линия с нива на VAF  $\geq 0,2$  и  $< 0,7$  са обозначени като положително хетерозиготни за варианта и вариантите с нива на VAF  $\geq 0,7$  са обозначени като положително хомозиготни за варианта. Пробите със хетерозиготни варианти бяха използвани, за да се определи дали наследената вариабилност на анализа би засегнала обозначаването на генотипа. Сх е определена и за двете гранични стойности (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипове), като х е делът на повторяеми тестове, които надвишават граничната стойност. За долната гранична стойност от 0,2 VAF Сх беше  $\geq 99,999\%$ , сочейки, че  $\geq 99,999\%$  от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хетерозиготни. По отношение на горната гранична стойност от 0,7 VAF Сх беше  $\leq 0,001\%$ , следователно сочейки, че  $\leq 0,001\%$  от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хомозиготни. [Таблица 23](#) обобщава резултатите по тип вариант.

Вариантите за герминативната линия с нива на VAF  $\geq 0,2$  и  $< 0,7$  са обозначени като положително хетерозиготни за варианта и вариантите с нива на VAF  $\geq 0,7$  са обозначени като положително хомозиготни за варианта. Пробите със хетерозиготни варианти бяха използвани, за да се определи дали наследената вариабилност на анализа би засегнала обозначаването на генотипа. Сх е определена и за двете гранични стойности (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипове), като х е делът на повторяеми тестове, които надвишават граничната стойност. По отношение на долната гранична стойност от 0,2 VAF Сх беше  $\geq 99,999\%$ , сочейки, че  $\geq 99,999\%$  от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хетерозиготни. За горната гранична стойност от 0,7 VAF Сх беше  $\leq 0,001\%$ , сочейки, че  $\leq 0,001\%$  от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хомозиготни. [Таблица 23](#) обобщава резултатите по тип вариант.

Таблица 23 Стойности на герминативната линия на Сх за хетерозиготни варианти

Тип вариант	Гранична стойност при 0,2 VAF	Гранична стойност при 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Инсерции	24/24	24/24
Делеции	35/35	35/35
Общо	153	153

## Соматичен

Соматични варианти с нива на VAF  $\geq 0,026$  се докладват като положителни (вариант). Наблюденията с нива на VAF  $\geq 0,01$  и  $< 0,026$  бяха сметени като двусмислени за целите на този анализ (нито положителни, нито отрицателни, означени като ниска честота на варианта). За да се оцени производителността, резултатите бяха изчислени по три начина:

- Най-добър случай: Всеки двусмислен резултат беше сметен за правилно положително обозначаване (съответствие с очакваните резултати)
- Най-лош случай: Всеки двусмислен резултат беше сметен за неправилно обозначаване (несъответствие с очакваните резултати)
- Случай на изключване: Всеки двусмислен резултат беше изключен от анализа

Три таблици, Таблица 24, Таблица 25 и Таблица 26, обобщават резултатите за обозначаване за съответно най-добрия случай, най-лошия случай и случая на изключване, заедно с долните и горните доверителни нива от 95% (LCL/UCL), изчислени по метода за оценка на Уилсън.

Таблица 24 Наблюдения на соматичното обозначаване за очакваните положителни резултати по тип вариант (най-добър случай)

Тип вариант	Правилно положително обозначаване				
	Наблюдавани	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 25 Наблюдения на соматичното обозначаване за очакваните положителни резултати по тип вариант (най-лош случай)

Тип вариант	Правилно положително обозначаване				
	Наблюдавани	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Таблица 26 Наблюдения на соматичното обозначаване за очакваните положителни резултати по тип вариант (отстранени двусмислени обозначавания)

Тип вариант	Правилно положително обозначаване				
	Наблюдавани	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Инсерции	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Делеции	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Соматични варианти с нива на VAF < 0,01 се докладват като отрицателни (див вид). За очаквани отрицателни соматични местоположения данните бяха оценени за честота на състояние без обозначаване и честота на състояние с правилно обозначаване от див тип. Правилните обозначавания от див тип са определени чрез изключване на състоянията без обозначаване и изваждане на наблюдаваните обозначавания, които попадат в зоната на двусмислие (нива на VAF  $\geq 0,01$  и < 0,026), както и на неправилните обозначавания, които са над граничната стойност (нива на VAF  $\geq 0,026$ ), от общия брой. Таблица 27 обобщава наблюдаваните, общия брой и процентните резултати за отрицателни соматични местоположения за честоти на състояния без обозначаване и честоти на състояния с правилно обозначаване от див тип заедно с долните и горните доверителни нива от 95% (LCL/UCL), изчислени чрез метода за оценка на Уилсън.

Таблица 27 Наблюдения на соматичното обозначаване за очакваните отрицателни резултати

Вариант Тип	Без обозначаване			Правилно обозначаване						
	Наблюдавани	Общо	Процент	Двусмислени	Неправилни	Правилни	Общо	Процент	95% LCL	95% UCL
Див тип	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Соматичните проби на различни нива на VAF за един и същи вариант бяха оценени, за да се определи C95 на анализа (в рамките на всеки тип вариант). За да се оцени вариационността в близост до граничната стойност на анализа, бяха използвани проби, за които се очакваха нива на VAF между 0,02 и 0,07. Стойността на C95 е определена за всеки вариант, като най-високите стойности на C95 за всеки тип вариант са отчетени в Таблица 28.

Таблица 28 Обобщение на соматични C95

Тип вариант	N	C95
SNV	74	0,0613
Инсерция	24	0,0573
Делеция	33	0,0575

## Производителност на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла)

### Общ преглед

NextSeq 550Dx се поддържа от два комплекта с реагенти: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). За да се докаже, че NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) може да отговори на изискванията за аналитично представяне, потвърдени и валидирани с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла), са проведени проучвания с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Извършени са две приготвяния на библиотеки с помощта на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – едно с работен процес за герминативна линия

и едно с работен процес за соматичен вариант. Библиотеките от всеки работен процес са тествани с три партиди NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) с помощта на три инструмента NextSeq 550Dx. Освен това тестването за всеки работен процес включва единично изпълняване с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла).

## Аналитична чувствителност (граница на празна проба [LoB] и граница на откриване [LoD])

Проверка с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) демонстрира, че Инструмент NextSeq 550Dx може да засече варианти при 0,05 VAF с грешка тип II  $\leq 0,05$  и че граничната стойност от 0,026 VAF, използвана от Somatic Variant Module (ефективна LoB), поддържа грешка тип I  $\leq 0,01$ . Въз основа на тези твърдения се очаква, че вариант при 0,05 VAF е по-голям или равен на 0,026 VAF в 95% от времето и че позиция от див тип е по-малко от 0,026 VAF в 99% от времето. За да се гарантира, че тези твърдения се изпълняват от NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла), са извършени неколкократно измервания на инструмента NextSeq 550Dx с проби от див тип (LoB проби) и с проби, съдържащи варианти при 0,05 VAF (LoD проби), с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Делът на обозначавания над и под граничната стойност от 0,026 след това е сравнен с твърденията, установени с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла).

В тестването са включени две LoD проби, всяка с уникален набор от варианти, насочени към 0,05 VAF, и съответни LoB проби, които са от див тип, за целеви варианти. За приготвяне на библиотеката са обработени LoD и LoB проби в репликати съответно по осем и седем с помощта на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Библиотеките първоначално са секвенирани с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла), за да се идентифицират вариантите/геномните координати за LoB/LoD оценка с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Всички варианти със средна стойност на VAF между 0,045 – 0,055 (LoD варианти) въз основа на резултатите от NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) са използвани за LoD анализ (N = 51 варианта). За LoB анализ са оценени 51 геномни координати.

За оценка на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) библиотеките са секвенирани в три изпълнения в три последователни дни с помощта на един и същи инструмент и партида на комплекта с реагенти. Това тестване достигна до 24 репликата за всеки от 51 LoD варианта и до 21 репликата за всяка от съответните позиции от див тип. Делът на обозначавания от див тип с VAF < 0,026 е представен в Таблица 29. Делът на обозначавания на LoD варианти с VAF, по-голяма или равна на 0,026, е представен в Таблица 30.

Таблица 29 Дял на обозначавания < 0,026 за позиции от див тип (оценка на твърдението за LoB)

Вариант Тип	Оценени позиции	Общо наблюдения	Брой измервания на VAF $\geq 2,6\%$	Дял < 2,6%	Дял 95% Доверителен интервал
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Инсерция	11	231	0	1	0,984 – 1
Делеция	8	168	0	1	0,978 – 1

Таблица 30 Дял на обозначавания  $\geq 0,026$  VAF за LoD варианти (оценка на твърдението за LoD)

Вариант Тип	Оценени позиции	Общо наблюдения	Брой измервания на VAF < 2,6%	Брой измервания на VAF $\geq 2,6\%$	Дял $\geq 2,6\%$	Дял 95% Доверителен интервал
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Инсерция	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Делеция	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

## Точност

### Герминативна линия

Проучването по-долу беше проведено, за да се оцени точността на обозначаване на вариант с Germline Variant Module с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Дванадесет уникални проби Platinum Genome са тествани с представителен анализ. Извършени са общо 11 изпълнявания с помощта на три инструмента NextSeq 550Dx и три комплекта NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).

Точността за SNV, инсерциите и делециите беше определена чрез сравняване на резултатите с добре характеризирани съставен референтен метод – Platinum Genome версия 2016-1.0. Резултатите за точност от единичното изпълняване на секвениране с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) са предоставени за справка. Обобщение на резултатите е предоставено в [Таблица 31](#).

Таблица 31 Обобщение на съответствието на герминативната линия

Критерии	Общо наблюдения (v2.5) <sup>1</sup>	Резултат от наблюдение (v2.5) <sup>2</sup>	Резултат от наблюдение (v2) <sup>3</sup>	Резултат от изпълняване (v2.5) <sup>4</sup>	Резултат от изпълняване (v2) <sup>4</sup>
PPA за SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA за инсерции	1056	100	100	100	100
PPA за делеции	1056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Изчислено като брой проби на изпълняване x брой изпълнявания (96 проби на изпълняване x 11 изпълнявания = 1056 наблюдения).

<sup>2</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред всички изпълнявания (въз основа на 11 изпълнявания за for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред 1 изпълняване (общо 96 наблюдения).

<sup>4</sup>Най-ниска стойност, когато данните от всяко изпълняване са анализирани сборно.



## Соматичен

Проучването по-долу беше проведено, за да се оцени точността на обозначаването на вариант на Somatic Variant Module в инструмента NextSeq 550Dx с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла). Десет FFPE проби Platinum Genome (две с варианти, разреждени до 0,05 VAF) бяха тествани с помощта на представителен анализ. Извършени са общо 11 изпълнявания с помощта на три инструмента NextSeq 550Dx и три партии NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).

Точността за SNV, инсерциите и делециите беше определена чрез сравняване на резултатите с добре характеризирания съставен референтен метод – Platinum Genome версия 2016-1.0. Резултатите за точност от единичното изпълняване на секвениране с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) са предоставени за справка. Обобщение на резултатите е предоставено в [Таблица 32](#).

Таблица 32 Обобщение на соматичното съответствие

Критерии	Общо наблюдения (v2.5) <sup>1</sup>	Резултат по наблюдение (v2.5) <sup>2</sup>	Резултат по наблюдение (v2) <sup>3</sup>	Резултат по изпълняване (v2.5) <sup>4</sup>	Резултат по изпълняване (v2) <sup>4</sup>
PPA за SNV	528	100	100	100	100
PPA за инсерции	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA за делеции	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Изчислено като брой проби на изпълняване x брой изпълнявания (48 проби на изпълняване x 11 изпълнявания = 528 наблюдения).

<sup>2</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред всички изпълнявания (въз основа на 11 изпълнявания за for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Най-ниска наблюдавана стойност по репликат на проба сред 1 изпълняване (общо 96 наблюдения).

<sup>4</sup>Най-ниска стойност, когато данните от всяко изпълняване са анализирани сборно.

## Прецизност

### Герминативна линия

Прецизността на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) с Germline Variant Module беше оценена с помощта на проби Platinum Genome и представителен анализ. Тестването се състоеше от едно приготвяне на библиотека с помощта на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и включваше 12 проби, обработени с осем репликата всяка. Библиотеките бяха секвенирани с три партии NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) и три инструмента NextSeq 550Dx за общо девет изпълнявания на секвениране.

Пробите с хетерозиготни варианти бяха използвани, за да се определи дали наследената вариабилност на анализа би засегнала обозначаването на генотипа (N = 153 уникални хетерозиготни варианта). Cx се определи и за двете гранични стойности на Germline Variant Module (0,2 за хетерозиготни и 0,7 за хомозиготни генотипове), като x е делът на повторяеми тестове, които надвишават граничната стойност. За долната гранична стойност от 0,2 VAF вариантът с минимум Cx за NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) беше > 99,9%, сочейки, че > 99,9% от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хетерозиготни. За горната гранична стойност от 0,7 VAF вариантът с максимум Cx за NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) беше < 1,5%, сочейки, че ≤ 1,5% от хетерозиготните варианти ще бъдат обозначени като хомозиготни. Таблица 33 обобщава резултатите по тип вариант. Стойностите на Cx от единичното изпълняване на секвениране с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) са предоставени за справка.

Таблица 33 Стойности на герминативната линия на Cx за хетерозиготни варианти

Тип вариант	N	Гранична стойност при 0,2 VAF		Гранична стойност при 0,7 VAF	
		Мин. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Мин. Cx (v2) <sup>2</sup>	Макс. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Макс. Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	>99,9%	>99,9%	1,5%	1,0%
Инсерции	24	100%	100%	0%	<0,1%
Делеции	35	100%	>99,9%	<0,1%	<0,1%

<sup>1</sup>Стойности на Cx, базирани на изчисленията за общо стандартно отклонение от дисперсионен анализ на компонент.

<sup>2</sup>Стойности на Cx, базирани на стандартните отклонения на пробите.

## Соматичен

Прецизността на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) със Somatic Variant Module беше оценена с помощта на FFPE проби Platinum Genome и представителен анализ. Тестването се състоеше от едно приготвяне на библиотека с помощта на TruSeq Custom Amplicon Kit Dx и включваше две проби с осем репликата всяка. Библиотеките бяха секвенирани с три партии NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) и три инструмента NextSeq 550Dx за общо девет изпълнявания на секвениране.

Соматични варианти с очаквани нива на VAF ≤ 0,10 VAF (N = 131 уникални варианта) бяха използвани за оценка на вариабилността на инструмента около граничната стойност на VAF на Somatic Variant Module (соматични варианти с ниво на VAF ≥ 0,026 са обозначени като положителни за варианта). Стойностите на C95 са определени за всеки от соматичните варианти. Стойностите на C95 представят VAF, при която вероятността да е по-висока от граничната стойност на VAF за Somatic Variant Module е 95%. Най-високите стойности на C95 по тип вариант са докладвани в Таблица 34. Резултатите за C95 от единичното изпълняване на секвениране с помощта на NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) са предоставени за справка.

Таблица 34 Обобщение на соматични C95

Тип вариант	Брой оценени варианти	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
-------------	-----------------------	-------------------------	-----------------------

SNV	74	0,064	0,063
Инсерции	24	0,062	0,061
Делеции	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>Стойности на C95, базирани на изчисленията за общо стандартно отклонение от дисперсионен анализ на компонент.

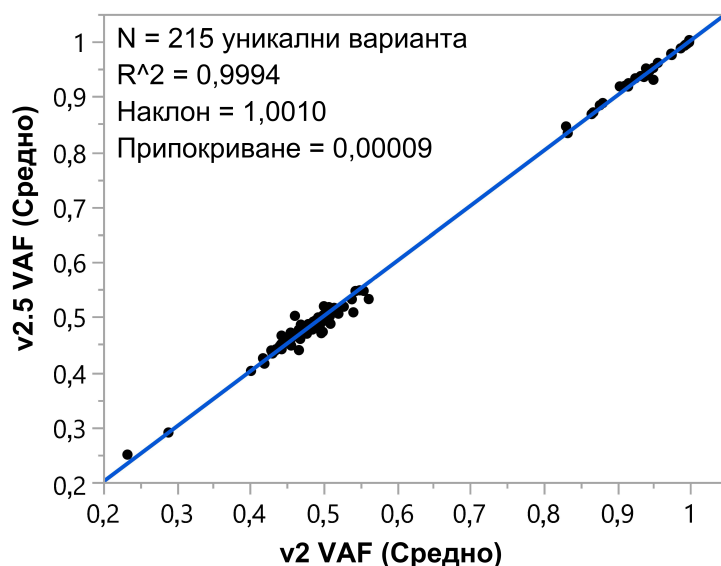
<sup>2</sup>Стойности на C95, базирани на стандартните отклонения на пробите.

## Сравняване на методи (комплект с регенти)

### Герминативна линия

Средните стойности на VAF от 215 уникални варианта бяха оценени с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) с помощта на резултати, генерирани от Germline Variant Module. Средните стойности на VAF бяха изчислени от 11 изпълнявания на секвениране (v2.5) и едно изпълняване на секвениране (v2). Най-малко осем репликата са използвани за изчисляване на средната стойност за всеки вариант. [Фигура 3](#) показва корелацията на VAF между двата комплекта с регенти. Въз основа на силната линейна корелация на VAF и сходните резултати между комплектите с регенти е установено, че характеристиките на производителността, първоначално проверени и валидирани с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) с Germline Variant Module, са приложими за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).

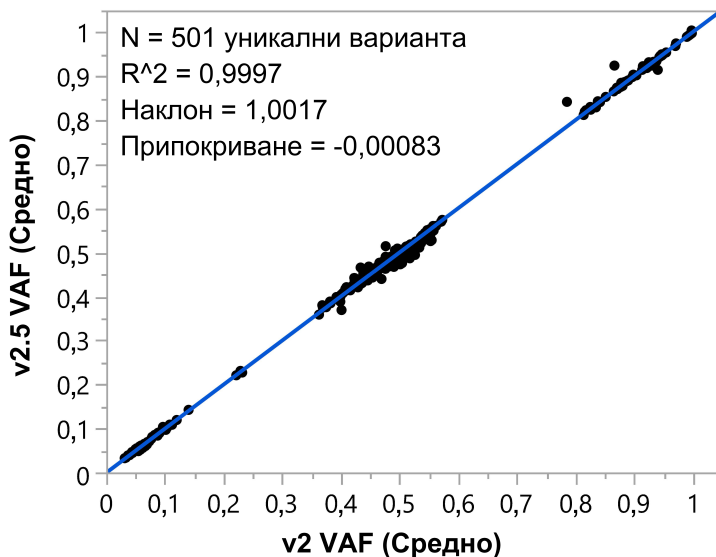
Фигура 3 Корелация на честотата на алелните варианти (VAF) на Germline Variant Module между NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).



## Соматичен

Средните стойности на VAF за 501 уникални варианта бяха оценени с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) с помощта на резултати, генерирани от Somatic Variant Module. Средните стойности на VAF бяха изчислени от 11 изпълнявания на секвениране (v2.5) и едно изпълняване на секвениране (v2). Най-малко три репликата са използвани за изчисляване на средната стойност за всеки уникален вариант. [Фигура 4](#) показва корелацията на VAF между двата комплекта с реагенти. Въз основа на корелацията на VAF и сходните резултати между комплектите с реагенти е установено, че характеристиките на производителността, проверени и валидирани с NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) с Somatic Variant Module, са приложими за NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).

Фигура 4 Корелация на честотата на алелните варианти (VAF) на Somatic Variant Module между NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла) и NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла).



## Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 200031448 v00	юни 2023 г.	<p>Първоначално издание.</p> <p>Предишен документ 1000000030326, заменен с този.</p> <p>Промени от документ 1000000030326 v6 в този нов документ:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Добавено е съдържание за поддръжка на незадължителен сървър Illumina DRAGEN за NextSeq 550Dx .</li> <li>• Актуализиран номер на част на въздушния филтър.</li> </ul> <p>Промени, направени преди това в документ 1000000030326:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Актуализации, направени за коригиране на съдържание, добавено по невнимание от изходния софтуер.</li> <li>• Добавено твърдение в „Предупреждения и предпазни мерки“ относно докладването на сериозни инциденти.</li> <li>• Добавено твърдение в „Принципи на процедурата“, посочващо предвидения потребител.</li> <li>• Премахната препратка към High Output Reagent Kit v2 (300 цикъла).</li> <li>• Добавена препратка към High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).</li> <li>• Добавена таблица с хронология на редакциите. Актуализиран адрес на упълномощен представител на ЕС.</li> </ul>

## Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента ѝ във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизвеждани по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такива) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТА(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2023 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните им притежатели. За конкретна информация относно търговските марки вижте [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Информация за контакт



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, САЩ  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

**Спонсор в Австралия**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Австралия

## Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за Вашия комплект на [support.illumina.com](http://support.illumina.com) в раздела *Documentation* (Документация).