

## Prospect

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO. NUMAI PENTRU EXPORT.

**Nr. catalog 20005715**

## Utilizarea preconizată

Instrumentul NextSeq 550Dx este destinat secvențierii bibliotecilor de ADN atunci când este folosit împreună cu teste de diagnosticare *in vitro* (DIV). Instrumentul NextSeq 550Dx trebuie utilizat împreună cu reactivi de diagnosticare *in vitro* specifici înregistrați, certificați sau aprobați și cu un anumit software de analiză.

## Principiile procedurii

illumina Instrumentul NextSeq 550Dx este destinat secvențierii de biblioteci de ADN împreună cu testări de diagnosticare *in vitro* și este destinat utilizării de către personalul laboratoarelor clinice calificat și instruit în ceea ce privește utilizarea de proceduri de diagnosticare *in vitro* efectuate într-un laborator clinic. Ca date introduse, NextSeq 550Dx folosește biblioteci generate din ADN, unde indexurile de probe și secvențele de captură sunt adăugate la țintele amplificate. Bibliotecile de probe sunt capturate într-o celulă de flux și secvențiate pe instrument utilizând secvențiere prin chimie de sinteză (SBS). Chimia SBS folosește o metodă cu terminator reversibil pentru a detecta bazele mononucleotidice etichetate fluorescent, pe măsură ce acestea sunt încorporate în catenele de ADN în creștere. Real-Time Analysis (RTA) efectuează analiza imaginilor și definirea bazelor și atribuie un scor de calitate fiecărei baze pentru fiecare ciclu de secvențiere. Atunci când se încheie analiza principală, analiza secundară poate fi executată cu ajutorul instrumentului, în vederea procesării definirilor bazelor. NextSeq 550Dx folosește diferite module de analiză secundară, în funcție de fluxul de lucru. Pentru modulele Germline sau Somatic Variant Module, procesarea include demultiplexarea, generarea fișierelor FASTQ, alinierea, definirea variantelor și generarea de fișiere în format de definire a variantelor (VCF și gVCF). Fișierele VCF și gVCF conțin informații despre variantele găsite în poziții specifice într-un genom de referință.

## Configurarea cu lansare dublă

NextSeq 550Dx include o configurare cu lansare dublă, pentru a permite utilizarea instrumentului în oricare dintre modurile de diagnosticare (Dx) sau utilizare exclusiv în scop de cercetare (RUO). Testările de secvențiere de diagnosticare *In vitro*, incluzând modulele Germline și Somatic Variant, sunt executate în modul de diagnosticare. Numai reactivi de secvențiere DIV pot fi folosiți în modul de diagnosticare. Caracteristicile de performanță și limitările de procedură pentru instrumentul NextSeq 550Dx au fost stabilite folosind modulele Germline și Somatic Variant în modul de diagnosticare.

## Limitările procedurii

1. A se utiliza la diagnosticarea *in vitro*.
2. Modulele Germline și Somatic Variant, atunci când sunt utilizate cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sau cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), sunt capabile să furnizeze:
  - rezultate de secvențiere  $\geq 90$  gigabaze (Gb)
  - lungimea de citire (în rularea cu perechi de baze împerecheate) de 2 x 150 de perechi de baze (bp)
  - baze egale cu sau mai mari de Q30  $\geq 75\%$  la lungimea de citire de 2 x 150 bp  
Un număr egal cu sau mai mare de 75% dintre baze au scor de calitate pe scara Phred  $\geq 30$ , indicând o acuratețe a definirii de baze mai mare de 99,9%
3. Citirile cu indeli (inserări, deleții sau combinații) pentru care lungimea conținutului este  $> 25$  bp nu sunt aliniată de software-ul de testare. Prin urmare, indeli cu lungimea  $> 25$  bp nu pot fi detectați de software-ul de testare.
4. Este posibil ca software-ul de testare să nu alinieze citirile de ampliconi cu conținut de variante extrem, conducând la raportarea regiunii ca fiind de tip sălbatic. Un astfel de conținut extrem include:
  - Citiri care conțin mai mult de trei indeli
  - Citirile cu lungimi de cel puțin 30 bp cu un conținut al unei singure variante de nucleotide (SNV)  $> 4\%$  din lungimea totală a ampliconului țintă (excluzând regiunile sondei)
  - Citirile cu lungimi  $< 30$  bp cu un conținut SNV  $> 10\%$  din lungimea totală a ampliconului (incluzând regiunile sondei)
5. Variantele mari, incluzând variantele de multinucleotide (MNV-uri) și indeli mari, pot fi raportate sub formă de variante separate mai mici în fișierul cu rezultate VCF.
6. Variantele pentru deleție pot fi filtrate sau omise atunci când se lucrează pe doi ampliconi alăturați dacă lungimea deleției este mai mare sau egală cu suprapunerea între ampliconii alăturați.
7. Sistemul nu poate detecta indeli dacă aceștia sunt direct adiacenți unei amorse și nu există niciun amplicon care să se suprapună. Pentru regiunile cu ampliconi care se suprapun, testarea nu poate detecta delețiile atunci când regiunea cu suprapunere este mai mică decât mărimea deleției care urmează a fi detectată. De exemplu, dacă regiunea de suprapunere între doi ampliconi adiacenți este reprezentată de două baze, testarea nu poate detecta nicio deleție care include ambele aceste baze. O deleție doar a uneia din aceste baze poate fi detectată.
8. La fel ca în cazul oricărui flux de lucru de pregătire a unei biblioteci pe bază de hibridizare, polimorfismele de context, mutațiile, inserțiile sau delețiile în regiunile de legare a oligonucleotidelor pot afecta alelele analizate și definirile efectuate în cursul secvențierii. De exemplu:
  - Este posibil ca o variantă în fază cu o variantă în regiunea amorsei să nu fie amplificată, având ca rezultat o definire fals negativă.

- Variantele din regiunea amorsei pot împiedica amplificarea alelei de referință, având ca rezultat o definire incorectă a variantei homozigote.
  - Variantele de indeli în regiunea amorsei pot cauza o definire fals pozitivă la finalizarea citirii adiacente amorsei.
9. Indelii pot fi filtrați din cauza polarizării catenei dacă ei apar lângă capătul unei citiri și suferă o decupare soft în timpul alinierii.
10. MNV-urile mici nu au fost validate și sunt raportate numai în Somatic Variant Module.
11. Delețiile sunt raportate în VCF la coordonata bazei precedente conform formatului VCF. Prin urmare, luați în considerare variantele adiacente înainte de a raporta că o definire de bază individuală este o referință homozigotă.
12. Limitări specifice pentru linia germinală:
- Instrumentul NextSeq 550Dx, utilizând Local Run Manager Germline Variant Module pentru NextSeq 550Dx, este conceput să livreze rezultate calitative pentru definirea variantei de linie germinală (de ex., homozigotă, heterozigotă, de tip sălbatic).
  - Când se utilizează cu Germline Variant Module, acoperirea minimă per amplicon necesară pentru o definire corectă a variantei este de 150x. Prin urmare, sunt necesare 150 de fragmente de ADN de suport, ceea ce este echivalent cu 300 de citiri suprapuse cu secvențiere la ambele capete. Numărul de probe și numărul total de baze vizate afectează acoperirea. Conținutul de GC și alt conținut genomic pot afecta acoperirea.
  - Variația numărului de copii poate afecta identificarea unei variante drept homozigotă sau heterozigotă.
  - Variantele într-un anumit context repetitiv sunt eliminate prin filtrare în fișierele VCF. Filtrul RMxN cu repetare este utilizat pentru a filtra variantele dacă întreaga secvență de variante sau o parte a acesteia este prezentă în mod repetat în genomul de referință adiacent poziției variantei. Pentru definirea variantei de linie germinală, sunt necesare cel puțin nouă repetări în referință pentru ca o variantă să fie filtrată. Sunt luate în considerare numai repetările cu lungimea de până la 5 bp (R5x9).
  - Un indel și un SNV într-o singură locație pot avea ca rezultat raportarea doar a unei singure variante.
13. Limitări specifice pentru Somatic.
- The Instrumentul NextSeq 550Dx, utilizând Local Run Manager Somatic Variant Module pentru NextSeq 550Dx, este conceput să livreze rezultate calitative pentru definirea variantei somatice (de ex., prezența unei variante somatice cu o frecvență a variantei mai mare sau egală cu 0,026, cu o limită a detecției de 0,05).
  - Când se utilizează cu Somatic Variant Module, acoperirea minimă per amplicon necesară pentru o definire corectă a variantei este de 450x per fond de oligonucleotide. Prin urmare, sunt necesare 450 de fragmente de ADN de suport per fond de oligonucleotide, ceea ce este echivalent cu 900 de citiri suprapuse cu secvențiere la ambele capete. Numărul de probe și numărul total de baze vizate afectează acoperirea. Conținutul de GC și alt conținut genomic pot afecta acoperirea.
  - Pentru definirea variantei somatice, sunt necesare cel puțin șase repetări în referință pentru ca varianta să fie filtrată și sunt luate în considerare numai repetările cu lungimea de până la 3 bp (R3x6).

- Somatic Variant Module nu poate face diferența între variantele de linie germinală și variantele somatice. Modulul este conceput să detecteze variante pentru o gamă de frecvențe de variante, dar frecvența variantei nu poate fi utilizată pentru a diferenția variantele somatice de variantele de linie germinală.
- Țesutul normal din cadrul specimenului influențează detectarea variantelor. Limita raportată a detecției se bazează pe o frecvență a variantei relativ la ADN total extras atât din țesutul tumoral, cât și din cel normal.

## Componentele produsului

illumina NextSeq 550Dx este alcătuit din următoarele:

1. Instrumentul NextSeq 550Dx (nr. catalog 20005715)
2. Printre componentele software pentru Instrumentul NextSeq 550Dx se numără următoarele:

Aplicație software	Funcție	Descriere
Software de operare NextSeq 550Dx (NOS)	Controlează funcționarea instrumentului	Aplicația software NOS gestionează operarea instrumentului în timpul secvențierii și generează imagini în scopul utilizării de către software-ul Real-Time Analysis (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Efectuează analiza principală	Aplicația software RTA convertește imaginile generate de NOS pentru fiecare dală per ciclu al rulării de secvențiere în fișiere de definire de baze, care sunt date de intrare pentru modulele de analiză ale Local Run Manager. Aplicația software RTA nu conține o interfață cu utilizatorul.
Local Run Manager	Interfața pentru selectarea modulului	Software-ul Local Run Manager este o soluție integrată în instrument pentru gestionarea utilizatorilor, selectarea modulului de analiză corespunzător și monitorizarea stării.
Somatic Variant Module	Efectuează analiza secundară	Acest modul de analiză al software-ului Local Run Manager procesează definiții de baze prin intermediul analizei secundare. Procesarea include demultiplexarea, generarea fișierelor FASTQ, alinierea, definirea variantelor și raportarea. Definitorul de variante (Pisces) generează fișierele VCF care conțin informații despre variantele găsite în poziții specifice într-un genom de referință și include frecvența măsurată a variantelor.

Aplicație software	Funcție	Descriere
Germline Variant Module	Efectuează analiza secundară	Acest modul de analiză al software-ului Local Run Manager procesează definiții de baze prin intermediul analizei secundare. Procesarea include demultiplexarea, generarea fișierelor FASTQ, alinierea, definirea variantelor și raportarea. Definitorul de variante (Pisces) generează fișierele VCF care conțin informații despre variantele găsite în poziții specifice într-un genom de referință și identifică fiecare variantă ca heterozigotă sau homozigotă.

3. **Opțional** Server Illumina DRAGEN pentru NextSeq 550Dx (nr. catalog 20086130), inclusiv următoarea componentă software:

Aplicație software	Funcție	Descriere
Illumina Run Manager	Interfață pentru selectarea modulului aplicației	Software-ul Illumina Run Manager este instalat pe serverul DRAGEN opțional, fără instrument. Illumina Run Manager permite gestionarea utilizatorilor, selectarea modulului de analiză și monitorizarea rulării de secvențiere și a stării analizei.

Serverul opțional Illumina DRAGEN pentru NextSeq 550Dx este disponibil numai în anumite țări. Contactați un reprezentant Illumina în ceea ce privește disponibilitatea regională.

## Condiții de utilizare

Pentru mai multe informații despre condițiile de utilizare, consultați secțiunea Considerente de mediu din *Ghidul de pregătire a locului destinat instrumentului NextSeq 550Dx* (nr. document 1000000009869).

Element	Specificații
Temperatură	Mențineți o temperatură a laboratorului între 19 °C și 25 °C (22 °C ±3 °C). Această temperatură este temperatura de funcționare a instrumentului. În timpul unui ciclu, nu permiteți variații de peste ±2 °C ale temperaturii ambiante.
Umiditate	Mențineți o umiditate relativă fără condens între 20 și 80%.

## Echipamente și materiale

### Echipamentele și materialele necesare, vândute separat

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles), nr. de catalog 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), nr. de catalog 20028871

## Echipamentele și materialele necesare, nefurnizate

### Consumabile furnizate de utilizator pentru cicluri de secvențiere

Consumabil	Furnizor	Scop
Șervețele cu alcool, alcool izopropilic 70% sau Etanol, 70%	VWR, nr. catalog 95041-714 (sau echivalent) Furnizor general pentru laboratoare	Curățare celulă de flux și uz general
Șervețele pentru laborator, fără scame	VWR, nr. catalog 21905-026 (sau echivalent)	Curățare celulă de flux și uz general

### Consumabile furnizate de utilizator pentru întreținerea instrumentelor

Consumabil	Furnizor	Scop
NaOCl, 5% (hipoclorit de sodiu)	Sigma-Aldrich, nr. catalog 239305 (sau echivalent de uz de laborator)	Spălarea instrumentului folosind metoda de spălare manuală după efectuarea rulării; diluat la 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, nr. catalog P7949	Spălarea instrumentului folosind opțiunile de spălare manuală; diluat la 0,05%
Apă destinată utilizării în laborator	Furnizor general pentru laboratoare	Spălarea instrumentului (metoda de spălare manuală)
Filtru de aer	illumina, nr. catalog 20063988	Filtrarea aerului care este aspirat de instrument pentru răcire

## Îndrumări cu privire la apa destinată utilizării în laborator

Folosiți întotdeauna apă destinată utilizării în laborator sau apă deionizată pentru a efectua procedurile specifice instrumentului. Nu utilizați niciodată apă de la robinet. Utilizați exclusiv tipurile de apă de mai jos sau echivalentul acestora:

- Apă deionizată
- Illumina PW1
- Apă de 18 Megaohmi (MΩ)
- Apă tratată cu sistemul Milli-Q
- Apă tratată cu sistemul Super-Q
- Apă destinată utilizării în cadrul procedurilor de biologie moleculară

## Avertizări și precauții



### ATENȚIE

Legislația federală a Statelor Unite permite vânzarea acestui dispozitiv numai de către sau la comanda unui medic sau a altui cadru medical licențiat să utilizeze sau să comande dispozitivul în statul în care își exercită profesiunea.

1. **Unele componente ale reactivilor furnizați de Illumina pentru utilizare împreună cu Instrumentul NextSeq 550Dx conțin substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile.** Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați Fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
2. Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.
3. Manipulați toate probele de sânge ca și cum se știe că sunt infecțioase cu virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul hepatitei B (HBV) și alți agenți patogeni transmisibili prin sânge (precauții universale).
4. Nerespectarea procedurilor menționate poate duce la rezultate greșite sau la reducerea semnificativă a calității probelor.
5. Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați probe și reactivi din seturi. După ce manipulați probe și reactivi din seturi, spălați-vă temeinic pe mâini.
6. Este necesară respectarea practicilor de laborator corespunzătoare și a igienei în laborator corespunzătoare pentru a împiedica produsele PCR să contamineze reactivii, instrumentarul și probele de ADN genomic. Contaminarea cu PCR poate determina rezultate inexacte și nefiabile.

7. Pentru a preveni contaminarea, asigurați-vă că zonele de pre-amplificare și post-amplificare dispun de echipamente și consumabile dedicate (de ex., pipete, vârfuri de pipetă, blocuri de încălzire, agitatoare prin vortexare și centrifuge).
8. Indexul pentru împerecherea probelor trebuie să corespundă exact structurii plăcii imprimate. Local Run Manager populează automat amorsele de indexare asociate cu denumirile probelor, atunci când acestea sunt introduse în modul. Recomandăm ca utilizatorul să verifice primerii de indexare asociați cu probele înainte de a iniția ciclul de secvențiere. Nepotrivirile între probă și configurația plăcii duc la pierderea identificării pozitive a probei și la raportarea de rezultate incorecte.
9. Se recomandă ferm instalarea unui software antivirus furnizat de utilizator, pentru a proteja computerul împotriva virusilor. Consultați manualul de utilizare pentru instrucțiuni privind instalarea.
10. Nu utilizați NextSeq 550Dx dacă oricare dintre panourile acestuia este îndepărtat. Utilizarea instrumentului cu îndepărtarea oricăruia dintre panouri conduce la expunerea potențială la tensiunea de linie și la tensiunile de curent continuu.
11. Nu atingeți platforma celulei de flux din compartimentul celulei de flux. Încălzitorul din acest compartiment funcționează la o temperatură între 22 °C și 95 °C și poate provoca arsuri.
12. Instrumentul cântărește aproximativ 84 kg (185 lb) și poate cauza vătămări grave dacă este scăpat pe jos sau manipulat greșit.

## Instrucțiuni de utilizare

Următoarele instrucțiuni de utilizare a Instrumentul NextSeq 550Dx necesită reactivi furnizați în NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) sau în NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).

## Creare rulare

Creați o rulare de secvențiere utilizând Local Run Manager sau Illumina Run Manager. Instrucțiunile de utilizare pentru Local Run Manager sunt incluse mai jos și în Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513). Pentru instrucțiuni privind modul de creare a unei rulări utilizând Illumina Run Manager, consultați Ghid software pentru Illumina Run Manager pentru NextSeq 550Dx (document nr. 200025239).

Pentru instrucțiuni privind selectarea între Local Run Manager sau Illumina Run Manager, consultați Ghid software pentru Illumina Run Manager pentru NextSeq 550Dx (document nr. 200025239). Pentru instrucțiuni detaliate privind anumite aplicații, consultați ghidul modulului sau al aplicației pentru analiza respectivă.

Următoarele instrucțiuni se referă la utilizarea modulelor Local Run Manager Germline și Somatic Variant.

## Setarea parametrilor

1. Conectați-vă la Local Run Manager.
2. Selectați **Create Run** (Creare rulare), apoi selectați **Somatic Variant** (Variantă somatică) sau **Germline Variant** (Variantă de linie germinală).



3. Introduceți o denumire de rulare care identifică rularea din secvențiere prin analiză..  
Folosiți caractere alfanumerice, spații, caractere de subliniere sau liniuțe.
4. [Opțional] Introduceți o descriere de rulare care să ajute la identificarea rulării.  
Folosiți caractere alfanumerice, spații, caractere de subliniere sau liniuțe.
5. Selectați numărul de probe și setul de indexuri din lista verticală.  
Luați în considerare următoarele informații atunci când faceți o selecție.
  - Lista verticală conține numere de probe cu un set de indexuri. De exemplu, 24-Set 1 indică 24 de probe care urmează a fi testate, cu indexuri din setul de indexuri 1.
  - Numerele seturilor de indexuri fac referire la seturi diferite de perechi de indexuri i5 și i7. Set 1 și Set 2 oferă ambele diversitatea indexurilor. Sunt oferite două seturi de indexuri, pentru a preveni epuizarea unui singur set.
  - Alegeți numărul de probe cel mai apropiat de numărul de probe pe care le testați. Dacă numărul exact de probe nu se află în listă, selectați numărul cel mai apropiat, dar mai mic decât numărul pe care îl testați. De exemplu, dacă doriți să testați 18 probe, selectați 16 probe.
  - Godeurile de probe sugerate și combinațiile de indexuri care îndeplinesc cerințele de diversitate a indexurilor sunt evidențiate cu verde.

## Importarea de fișiere manifest pentru rulare

1. Asigurați-vă că manifestele pe care doriți să le importați sunt disponibile într-o locație accesibilă din rețea sau pe o unitate USB.
2. Selectați **Import Manifests** (Importare manifeste).
3. Navigați la fișierul manifest și selectați manifestele pe care doriți să le adăugați.

**NOTĂ** Pentru a face fișierele manifest disponibile pentru toate rulările folosind modulele de analiză Germline Variant sau Somatic Variant, adăugați manifestele folosind caracteristica Module Settings (Setări modul). Această funcție necesită permisiuni la nivel de utilizator administrator. Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)*.


## Specificarea probelor pentru rulare

Specificați probele pentru rulare folosind una dintre opțiunile și indicațiile care urmează.


**Enter samples manually** (Introducere manuală a probelor) – folosiți tabelul necompletat din ecranul Create Run (Creare rulare).

**Import samples** (Importare probe) – navigați la un fișier extern într-un format de valori separate prin virgulă (\*.csv). În ecranul Create Run (Creare rulare) este disponibil pentru descărcare un șablon.

## Introducerea manuală a probelor

1. Introduceți o denumire de probă unică (*modulul de analiză Somatic Variant*) sau un ID de probă unic (*modulul de analiză Germline Variant*).  
Folosiți caractere alfanumerice, liniuțe sau caractere de subliniere.
2. [Opțional] Pentru probe de control pozitive sau negative, faceți clic dreapta și selectați tipul de control. Controlul dintr-un godeu cu probă populează automat godeul corespunzător din celălalt fond cu același control.
3. [Opțional] Introduceți o descriere a probei în câmpul Sample Description (Descriere probă).  
Folosiți caractere alfanumerice, liniuțe sau caractere de subliniere.
4. Selectați un adaptor Index 1 din lista verticală Index 1 (i7).  
Când folosiți godeurile cu probe sugerate, software-ul populează automat adaptoarele de indexuri i7 și i5 care îndeplinesc cerințele de diversitate a indexurilor. Dacă numărul exact al probelor pe care le testați nu se află în listă, asigurați-vă că selectați adaptoare de indexuri pentru godeuri suplimentare.
5. Selectați un adaptor Index 2 din lista verticală Index 2 (i5).
6. Selectați un fișier manifest din lista verticală Manifest.  
Probele din Fondul A necesită un alt manifest decât probele din Fondul B.
7. Alegeți o opțiune de vizualizare, imprimare sau salvare a structurii plăcii ca referință pentru pregătirea bibliotecilor:
  - Selectați pictograma  **Print** (Imprimare) pentru a afișa structura plăcii. Selectați **Print** (Imprimare) pentru a imprima structura plăcii.
  - Selectați **Export** (Exportare) pentru a exporta informații despre probe într-un fișier extern.
8. Selectați **Save Run** (Salvare rulare).

## Importarea probelor

1. Selectați **Import Samples** (Importare probe) și navigați până la locația fișierului cu informații despre probe. Există două tipuri de fișiere pe care le puteți importa.
  - Selectați **Template** (Șablon) în ecranul Create Run (Creare rulare) pentru a crea o nouă structură a plăcii. Fișierul șablon conține anteturile de coloană corecte pentru import. Introduceți informații despre probe în fiecare coloană pentru probele din rulare. Ștergeți informațiile cu titlu de exemplu din celulele nefolosite, apoi salvați fișierul.
  - Folosiți un fișier cu informații despre probe care a fost exportat din modulul Germline Variant sau din modulul Somatic Variant folosind caracteristica Export (Exportare).
2. Selectați pictograma  **Print** (Imprimare) pentru a afișa structura plăcii.
3. Selectați **Print** (Imprimare) pentru a imprima structura plăcii ca referință pentru pregătirea bibliotecilor.
4. Selectați **Save Run** (Salvare rulare).

## Pregătirea cartușului cu reactivi

Asigurați-vă că respectați cu atenție îndrumările privind cartușul cu reactivi, pentru o secvențiere cu succes.

1. Scoateți cartușul cu reactivi de la depozitarea la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
2. Alegeți una din următoarele metode pentru a decongela reactivii. Nu cufundați cartușul. După ce cartușul este decongelat, uscați-l înainte de a trece la pasul următor.

Temperatură	Timp de decongelare	Limită de stabilitate
Baie cu apă între 15 °C și 30 °C	60 de minute	A nu se depăși 6 ore
între 2 °C și 8 °C	7 ore	A nu se depăși 5 zile

**NOTĂ** Dacă mai mult de un cartuș se decongelează în aceeași baie cu apă, lăsați să treacă un timp de decongelare suplimentar.

3. Răsturnați cartușul de cinci ori pentru a amesteca reactivii.
4. Inspectați fundul cartușului pentru a vă asigura că reactivii sunt decongelați și nu prezintă precipitate. Confirmați că pozițiile 29, 30, 31 și 32 sunt decongelate, deoarece acestea sunt cele mai mari și decongelarea lor durează cel mai mult.
5. Loviți ușor masa de laborator pentru a reduce bulele de aer.  
Pentru cele mai bune rezultate, treceți direct la încărcarea probei și la configurarea rulării.

## Pregătirea celulei de flux

1. Scoateți o cutie nouă cu Flow Cell de la depozitarea la temperaturi între 2 °C și 8 °C.
2. Îndepărtați ambalajul de folie de pe cutie și dați deoparte la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.

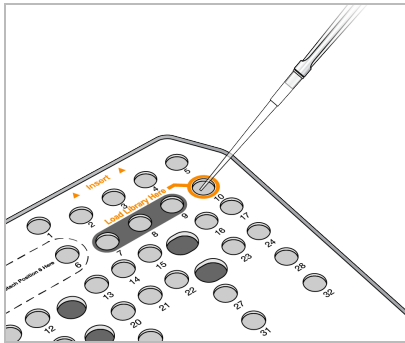
## Pregătirea bibliotecilor pentru secvențiere

Denaturați și diluați bibliotecile la un volum de încărcare de 1,3 ml. În practică, concentrația de încărcare poate varia în funcție de metodele de pregătire și de cuantificare a bibliotecilor. Diluarea bibliotecilor de probe depinde de complexitatea fondurilor de oligonucleotide. Pentru indicații privind pregătirea bibliotecilor de probe pentru secvențiere, inclusiv diluarea și cumulara bibliotecilor, consultați secțiunea Instrucțiuni de utilizare pentru setul aplicabil de pregătire a bibliotecilor. Optimizarea densității grupurilor de celule pe NextSeq 550Dx este necesară.

## Încărcarea bibliotecilor în cartușul cu reactivi

1. Curățați folia de sigilare care acoperă rezervorul nr. 10 etichetat **Load Library Here** (Încărcați biblioteca aici) folosind un șervețel care nu lasă scame.
2. Străpungeți folia de sigilare cu un vârf curat de pipetă de 1 ml.
3. Încărcați 1,3 ml din bibliotecile pregătite în rezervorul nr. 10 etichetat **Load Library Here** (Încărcați biblioteca aici). Evitați să atingeți folia de sigilare în timp ce eliberați bibliotecile.

Figura 1 Încărcarea bibliotecilor



## Configurarea unei rulări de secvențiere

Consultați Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 1000000009513) pentru instrucțiuni complete de configurare a rulării.

1. Conectați-vă la NextSeq 550Dx cu parola dvs. pentru software-ul Local Run Manager sau Illumina Run Manager.
2. Din ecranul de întâmpinare al software-ului NOS, selectați **Sequence** (Secvențiere).
3. Selectați o rulare din listă, apoi selectați **Next** (Înainte).  
Se deschide o serie de ecrane de configurare a rulării în următoarea ordine: Load Flow Cell (Încărcare celulă de flux), Load Buffer Cartridge (Încărcare cartuș cu soluție tampon), Load Reagent Cartridge (Încărcare cartuș reactiv) și Pre-run Check (Verificare înainte de rulare).

**NOTĂ** Rulările sunt accesibile numai utilizând același Run Manager utilizat la planificarea rulării. Pentru instrucțiuni privind modul de setare a software-ului Run Manager, consultați Ghid software pentru Illumina Run Manager pentru NextSeq 550Dx (document nr. 200025239).

4. Atunci când apare ecranul Load Flow Cell (Încărcare celulă de flux), curățați și apoi încărcați celula de flux.
  - Scoateți celula de flux din ambalajul de folie.
  - Desfaceți ambalajul capsulă din plastic transparent și scoateți celula de flux
  - Curățați suprafața de sticlă a celulei de flux cu un șervețel cu alcool care nu lasă scame. Uscați sticla cu un șervețel de laborator care nu lasă scame
  - Asigurați-vă că suprafața de sticlă a celulei de flux este curată. Dacă este cazul, repetați pasul de curățare.
  - Îndepărtați celula de flux folosită într-o rulare anterioară.
  - Aliniați celula de flux peste piciorușele de aliniere și așezați celula de flux pe platformă.
5. Selectați **Load** (Încărcare).  
Ușa se închide automat, ID-ul celulei de flux apare pe ecran și senzorii sunt verificați.

6. Urmăți mesajele software-ului care vă solicită să goliți containerul pentru reactivi utilizați, să încărcați cartușul cu tampon NextSeq 550Dx și să încărcați cartușul cu reactivi NextSeq 550Dx.  
Atunci când cartușul cu soluție tampon și cartușul cu reactivi NextSeq 550Dx sunt încărcate, software-ul citește și înregistrează RFID. ID-urile cartușului cu soluție tampon și cartușului cu reactivi apar pe ecran și senzorii sunt verificați.
7. Atunci când verificarea automată anterior rulării este finalizată, selectați **Start** (Pornire). (Nu este necesar dacă instrumentul este configurat să pornească automat.)
8. Când rularea începe, apare ecranul Sequencing (Secvențiere). Acest ecran oferă o reprezentare vizuală a rulării în curs, incluzând intensitățile și scorurile de calitate (Q-scores).

## Rezultate

Real-Time Analysis (RTA) este un software integrat care efectuează analiza imaginilor și definirea bazelor și atribuie un scor de calitate fiecărei baze pentru fiecare ciclu de secvențiere. La finalizarea analizei primare, modulul de aplicație selectat începe automat analiza secundară. Procesele de analiză secundară descrise aici sunt pentru modulele Local Run Manager Germline și Somatic Variant de pe Instrumentul NextSeq 550Dx.

## Demultiplexare

Demultiplexarea compară fiecare secvență de citire de indexuri cu secvențele de indexuri specificate pentru rulare. În această etapă, nu este luată în considerare nicio valoare calitativă.

Citirile de indexuri sunt identificate folosind următorii pași:

- Probele sunt numerotate începând de la 1, în funcție de ordinea în care sunt enumerate pentru rulare.
- Numărul de probă 0 este rezervat pentru grupurile de celule care nu au fost alocate unei probe.
- Grupurile de celule sunt alocate unei probe atunci când secvența de indexuri se potrivește exact sau când există cel mult o singură nepotrivire per citire de indexuri.

## Generarea fișierelor FASTQ

După demultiplexare, software-ul generează fișiere de analiză intermediare în formatul FASTQ, care este un format text folosit pentru a reprezenta secvențe. Fișierele FASTQ conțin citiri pentru fiecare probă și scorurile de calitate asociate. Grupurile de celule care nu au trecut de filtrare sunt excluse.

Fiecare fișier FASTQ conține citiri pentru o singură probă și denumirea probei respective este inclusă în denumirea fișierului FASTQ. În modulele Germline Variant și Somatic Variant, opt fișiere FASTQ sunt generate per probă per fond de oligoelemente, patru din Citirea 1 și patru din Citirea 2. Astfel se obține un total de 8 și 16 fișiere FASTQ per probă pentru modulul Germline și, respectiv, modulul Somatic. Fișierele FASTQ reprezintă principala introducere de date pentru aliniere.

## Aliniere

În timpul etapei de aliniere, algoritmul Smith-Waterman în benzi aliază grupurile de celule din fiecare probă la secvențele de amplicon specificate în fișierul manifest.

Algoritmul Smith-Waterman în benzi efectuează alinieri de secvențe semiglobale, pentru a determina regiunile similare dintre două secvențe. În loc să compare secvența totală, algoritmul Smith-Waterman compară segmente de toate lungimile posibile.

Fiecare citire cu perechi de baze împerecheate este evaluată în ceea ce privește alinierea sa la secvențele relevante cu rol de măsurare pentru respectiva citire.

- Citirea 1 este evaluată pe baza complementului invers al oligoelementelor cu locus specific în aval (DLSO).
- Citirea 2 este evaluată pe baza oligoelementelor cu locus specific în amonte (ULSO).
- Dacă începutul unei citiri se potrivește cu o secvență cu rol de măsurare cu nu mai mult de o nepotrivire, lungimea integrală a citirii este aliniată la ținta amplicon pentru respectiva secvență.
- Dacă începutul unei citiri se potrivește cu o secvență cu rol de măsurare cu nu mai mult de trei diferențe (nepotriviri sau deplasări cauzate de indelii principali), lungimea integrală a citirii este aliniată la ținta amplicon pentru respectiva secvență.
- Indelii din cadrul DLSO și ULSO nu sunt observați, dată fiind chimia de testare.

Alinierea sunt filtrate din rezultatele de aliniere pe baza ratelor de nepotrivire fie din regiunea de interes, fie din întregul amplicon, în funcție de lungimea ampliconului. Alinierea filtrate sunt scrise în fișierele de alinieri ca nealiniat și nu sunt folosite în definirea variantelor.

## Definirea variantelor

Definitorul de variante Pisces este conceput pentru a efectua definiri de variante SNV și indeli din bibliotecile pregătite pentru instrument.

## Rapoarte și fișiere cu rezultate suplimentare

Modulele de analiză a variantelor produc rapoarte în format PDF și text delimitat prin tabulatori (\*.txt) care afișează metrice precum profunzimea secvențierii și numărul de variante. De asemenea, modulele produc fișiere cu rezultate în formate precum VCF și Formatul de definire a variantelor pentru genom (gVCF) pentru aplicații de definire a variantelor.

## Procedurile de control al calității

Software-ul NextSeq 550Dx evaluează fiecare rulare, probă și definire de baze în funcție de valorile de control al calității. Probele de control pozitive sau negative sunt, de asemenea, recomandate în pregătirea bibliotecilor și trebuie evaluate. Evaluați controalele după cum urmează:

- **Control negativ (control fără șablon) sau alt control negativ** – trebuie să genereze rezultatul preconizat. Dacă controlul negativ generează un rezultat diferit de cel preconizat, atunci s-a produs o eventuală eroare în urmărirea probelor, o înregistrare incorectă a amorselor de indexare sau o contaminare.
- **Probă de control pozitivă** – trebuie să genereze rezultatul preconizat. Dacă controlul pozitiv generează un rezultat diferit de cel preconizat, atunci s-a produs o eventuală eroare în urmărirea probelor sau înregistrarea incorectă a amorselor de indexare.

## Caracteristici de performanță

Caracteristicile de performanță pentru Instrumentul NextSeq 550Dx au fost stabilite folosind modulele Germline și Somatic Variant Module împreună cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx și cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și confirmate folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Studiile au inclus Indexarea probelor, Transferul probelor, Introducerea de ADN, Sensibilitatea analitică (Limită de blank/Limită de detecție), Acuratețea, Precizia, Compararea metodelor și Reproducibilitatea.

Studiile analitice care au folosit NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) au fost concepute să evalueze afirmațiile privind performanța stabilite anterior cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Rezultatele demonstrează că seturile de reactivi (v2 și v2.5) au performanțe comparabile folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Consultați *prospectul pentru TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* pentru caracteristicile de performanță privind factorii preanalitici, precum metodele de extracție sau substanțele interferente.

## Definițiile calculelor folosite pentru caracteristicile de performanță

1. Procentul de concordanță pozitivă (PPA) este calculat ca proporția de loci clasificați ca variante de o metodă de referință pe care testarea o raportează corect.
  - $(\text{nr. de loci de variante raportați corect de testare}) / (\text{nr. total de loci de variante})$   
Locii de variante raportați de testare care sunt concordanți cu metoda de referință sunt cu adevărat pozitivi (TP). Locii de variante raportați de testare ca definiții de referință sau ca definiții ale unor variante diferite sunt fals negativi (FN).
2. Procentul de concordanță negativă (NPA) este calculat ca proporția de loci clasificați ca fiind de tip sălbatic de o metodă de referință pe care testarea o raportează corect.
  - $(\text{nr. de loci de tip sălbatic raportați corect de testare}) / (\text{nr. total de loci de tip sălbatic})$   
Locii de tip sălbatic raportați de testare care sunt concordanți cu metoda de referință sunt cu adevărat negativi (TN). Locii de tip sălbatic raportați de testare sunt fals pozitivi (FP).
3. Procentul de concordanță globală (OPA) este calculat ca proporția de loci raportați corect de testare față de o metodă de referință.

- $((\text{nr. de loci de variante raportați corect de testare}) + (\text{nr. de loci de tip sălbatic raportați corect de testare})) / ((\text{nr. total de loci de variante}) + (\text{nr. total de loci de tip sălbatic}))$
4. Calculele PPA, NPA și OPA nu includ absențele definițiilor (locii de variante sau de referință care nu trec de unul sau mai multe filtre de calitate).
  5. Indicele de definire autozomală este calculat ca numărul total de loci care trec de filtre împărțit la numărul total de poziții secvențiate pentru cromozomii 1-22; cromozomii X și Y sunt excluși. Această valoare nu ia în considerare concordanța definițiilor cu metoda de referință.

## Performanța NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles)

### Indexarea probelor

Primerii de indexare pentru probe, adăugați în timpul pregătirii bibliotecilor, atribuie o secvență unică fiecărei probe de ADN. Aceste secvențe unice permit cumulara mai multor probe într-o singură rulare de secvențiere. Indexarea probelor este folosită atât pentru fluxurile de lucru de linie germinală, cât și pentru cele somatice. Scopul acestui studiu a fost de a stabili numărul minim (8) și maxim (96) de probe care pot fi procesate într-o singură rulare de secvențiere de către Instrumentul NextSeq 550Dx. Au fost testate opt probe unice Platinum Genome cu 12 combinații diferite de amorse de indexare per probă. Rezultatele probelor din patru rulări de secvențiere folosind Germline Variant Module au fost comparate cu Platinum Genomes versiunea 2016-1.0.

Pentru primul set de rulări, au fost testate 96 de biblioteci de probe indexate în mod unic, prin intermediul unei testări reprezentative concepute să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze per catenă în toți cei 23 de cromozomi umani, pentru a verifica abilitatea testării de a efectua o definire de genotipare în mod consecvent pentru o probă dată în diferite combinații de amorse de indexare. Pentru al doilea set de rulări, opt biblioteci de probe indexate în mod unic au fost secvențiate în două rulări de secvențiere, pentru a verifica numărul minim de indexuri acceptate.

Pentru rulările cu 96 de indexuri, PPA pentru SNV-uri a variat de la 98,7% la 100%, PPA pentru inserții și deleții a fost de 100% și NPA a fost de 100% pentru fiecare din cele 96 de combinații de indexuri. Rulările cu 8 indexuri au avut valori PPA de 100% (SNV-uri, inserții și deleții) și NPA de 100% pentru fiecare din cele opt combinații de indexuri.

### Transferul probelor

Instrumentul NextSeq 550Dx permite secvențierea de probe multiple plus controale în cadrul unei singure rulări de secvențiere. A fost realizat un studiu pentru a evalua amploarea transferului probelor în cadrul unei rulări de secvențiere (în cadrul aceleiași rulări) și între rulări de secvențiere (de la o rulare la alta). Două probe Platinum Genome, una masculină și una feminină, au fost testate cu o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze (150 de ampliconi) din 23 de cromozomi diferiți, incluzând ambii cromozomi pentru sex. Bibliotecile au fost secvențiate pe instrumentul NextSeq 550Dx, folosind Germline Variant Module. Transferul probelor masculine în probele feminine a fost observat prin prezența citirilor de ampliconi ai cromozomului Y în probele feminine.



Transferul în cadrul aceleiași rulări poate fi introdus în timpul generării grupurilor de celule, al definirii bazelor din ciclurile de indexare și al demultiplexării probelor. Pentru testarea transferului probelor în cadrul unei rulări de secvențiere, un fond de bibliotecă constând din 46 de replicări, fiecare alcătuită din probe masculine și feminine, plus patru controale fără șablon a fost secvențiat o dată pe instrumentul NextSeq 550Dx. Transferul probelor în cadrul aceleiași rulări a fost evaluat prin compararea acoperirii ampliconilor cromozomului Y a fiecărei replicări feminine cu acoperirea medie a ampliconilor cromozomului Y a tuturor replicărilor masculine din fond. Mediana observată pentru transferul în cadrul aceleiași rulări a fost de 0,084%.

Pentru testarea transferului probelor de la o rulare la alta, două fonduri de bibliotecă au fost pregătite și secvențiate consecutiv pe un instrument NextSeq 550Dx. Primul fond conținea 46 de replicări alcătuite din probă feminină, plus două controale fără șablon. Al doilea fond conținea 46 de replicări alcătuite din probă masculină, plus două controale fără șablon. Ambele fonduri au folosit același set de adaptoare de indexuri. Fondul feminin a fost secvențiat primul, urmat de o rulare de secvențiere ulterioară a fondului masculin, urmată de o altă rulare de secvențiere repetată a fondului feminin. Transferul probelor de la o rulare la alta a fost evaluat prin compararea acoperirii ampliconilor cromozomului Y între replicările corespunzătoare ale rulării repetate a fondului feminin și ale rulării fondului masculin. Mediana observată pentru transferul de la o rulare la alta a fost de 0,0076%

## Introducere de ADN

### Sânge (linie germinală)

Intervalul de introduceri de ADN sanguin pentru pregătirea unei biblioteci cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx folosind fluxul de lucru pentru Germline Variant Module a fost stabilit pentru Instrumentul NextSeq 550Dx. Acest interval a fost evaluat efectuând un studiu privind diluarea în serie folosind 13 probe Platinum Genome cu o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți. Biblioteca a fost secvențiată pe două instrumente NextSeq 550Dx, folosind un lot de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Cinci probe au fost testate în dublu exemplar la cinci niveluri de introducere de ADN variind de la 250 ng la 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng și 12 ng). Opt probe au fost testate ca replicare unică la fiecare dintre cele cinci niveluri de introducere de ADN. Pentru determinarea acurateței, genotipurile probelor au fost comparate cu Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. Rezultatele au fost determinate pentru fiecare nivel de introducere. PPA pentru fiecare tip de variantă (SNV-uri, inserții și deleții) este prezentat în [Tabelul 1](#); NPA este prezentat în [Tabelul 2](#). Toate nivelurile de introducere au avut o acuratețe similară. Introducerea de ADN recomandată pentru TruSeq Custom Amplicon Kit Dx este de 50 ng cu 25 ng și 100 ng furnizând o limită inferioară și superioară pentru a îndeplini caracteristicile de performanță.

Tabelul 1 Rezultatele PPA pentru fiecare introducere de ADN după tipul de variantă

Introducere de ADN (ng)	Tip de variantă	Variante preconizate	TP	FN	Variante cu absența definițiilor	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	Insertie	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	Deleție	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

Tabelul 2 NPA pentru fiecare introducere de ADN

Introducere de ADN (ng)	TN	FP	Absența definițiilor ca referință	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 (Somatic)

Intervalul de introduceri de ADN sanguin fixate în soluție de formalină și incluse în bloc de parafină (FFPE) pentru pregătirea unei biblioteci cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx folosind fluxul de lucru pentru Somatic Variant Module a fost stabilit pentru instrumentul NextSeq 550Dx. Intervalul de introduceri de ADN a fost evaluat efectuând un studiu privind diluarea în serie folosind trei probe Platinum Genome cu o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți. Liniile celulare Platinum Genome GM12878 și GM12877 au fost fixate în soluție de formalină și incluse în

bloc de parafină, operațiune urmată de extracția de ADN. GM12878 a fost diluată cu GM12877 astfel încât frecvențele alelice ale variantelor (VAF) pentru 79 de variante (55 SNV-uri, 9 inserții și 15 deleții) au fost aproape de 0,025, 0,05 sau 0,10. În plus, fiecare probă a avut 91 de variante cu frecvențe superioare ale variantelor, de până la 1,0 VAF. Probele au fost procesate în dublu exemplar la cinci niveluri de introducere de ADN cu ciclul cantitativ delta mediu (dCq) de 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 și 7,8 măsurat de TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Fiecare bibliotecă a fost secvențiată pe două instrumente NextSeq 550Dx, folosind două loturi de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Pentru determinarea acurateții, definițiile variantelor pentru probe au fost comparate cu Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. PPA pentru fiecare tip de variantă (SNV-uri, inserții și deleții) este prezentat în [Tabelul 3](#); NPA este prezentat în [Tabelul 4](#). Introducerea de ADN recomandată pentru variante la cel puțin 0,05 VAF este  $dCq \leq 4$ , cu 4,6 furnizând o limită inferioară pentru a îndeplini caracteristicile de performanță.

Tabelul 3 Rezultatele PPA pentru fiecare introducere de ADN după tipul de variantă

dCq mediu	Tip de variantă	Variante preconizate	Absențe ale definițiilor preconizate	VAF de diluare țintă					
				0,025		0,05		0,10	
				Variante cu absența definițiilor	PPA (%)	Variante cu absența definițiilor	PPA (%)	Variante cu absența definițiilor	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nu se aplică.	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	Inserție	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	Deleție	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

Tabelul 4 NPA pentru fiecare introducere de ADN

dCq mediu	Tip sălbatic preconizat	VAF de diluare țintă					
		0,025		0,05		0,10	
		Absența definițiilor ca referință	NPA (%)	Absența definițiilor ca referință	NPA (%)	Absența definițiilor ca referință	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

### Sensibilitate analitică (Limită de blanc [LoB] și Limită de detecție [LoD])

Acest studiu a fost realizat pentru a evalua Limita de blanc (LoB) și Limita de detecție (LoD) pentru Somatic Variant Module pe instrumentul NextSeq 550Dx. Acesta a fost efectuat folosind o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți. Linile celulare Platinum Genome GM12878 și GM12877 au fost fixate în soluție de formalină și incluse în bloc de parafină, operațiune urmată de extracția de ADN. GM12878 a fost diluată cu GM12877 astfel încât frecvențele variantelor pentru 74 de variante (53 SNV-uri, 7 inserții și 14 deleții) au fost de  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 și GM12878 diluată (GM12878-D) au fost testate timp de șase zile de inițiere consecutive cu un singur instrument, alternând între două loturi de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), pentru un total de șase rulări de secvențiere. Acest test a avut ca rezultat 60 de replicări pentru fiecare variantă din GM12878-D și 72 de replicări pentru fiecare coordonată de tip sălbatic corespunzătoare din GM12877 pentru fiecare lot de reactivi. LoB și LoD au fost calculate folosind abordarea clasică menționată în CLSI EP17-A2 bazată pe opțiunea nonparametrică. LoB și LoD au fost calculate pentru SNV-uri, inserții și deleții separat, prin cumularea frecvențelor variantelor pentru un tip de variantă dat. Eroarea de Tip I a fost definită ca 0,01 și eroarea de Tip II a fost definită ca 0,05.

Pentru LoB, frecvențele cumulate ale variantelor au fost sortate de la cele mai mici la cele mai mari și a fost calculată poziția de pe locul 99 pentru fiecare lot de reactivi pentru fiecare tip de variantă (Tabelul 5). Somatic Variant Module folosește o limită (LoB efectivă) de 0,026 VAF pentru determinarea detecției calitative a variantelor. LoB calculată a confirmat faptul că această limită duce la o eroare de Tip I nu mai mare de 0,01.

Tabelul 5 Limita de blanc

Tip de variantă	Observații totale	LoB lot de reactivi 1 (%)	LoB lot de reactivi 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Inserție	504	0,56	0,56
Deleție	1008	1,20	1,20

Pentru LoD, a fost calculat procentul de frecvență a mutațiilor individuale pentru fiecare lot de reactivi pentru fiecare tip de variantă sub limita de 0,026 [Tabelul 6](#). Deoarece procentele au fost mai mici decât eroarea de Tip II de 5% (0,05), mediana frecvențelor combinate ale variantelor a fost calculată ca LoD ([Tabelul 6](#)). Ca LoD pentru fiecare tip de variantă a fost luată drept cea mai mare dintre cele două valori calculate pentru cele două loturi de reactivi – 4,97% pentru SNV-uri, 5,12% pentru inserții și 5,26% pentru deleții.

Tabelul 6 Limita de detecție

Lot de reactivi	Tip de variantă	Observații totale	Nr. de măsurări VAF < 2,6%	Procent de măsurări VAF < 2,6%	Limita de detecție (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Inserție	420	6	1,4	5,08
	Deleție	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Inserție	420	5	1,2	5,12
	Deleție	840	7	0,80	5,26

## Acuratețe

### Linie germinală

Studiul următor a fost realizat pentru a evalua acuratețea de definire a variantelor a Germline Variant Module pe Instrumentul NextSeq 550Dx, folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Au fost testate 13 probe unice Platinum Genome folosind o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze (150 de ampliconi) din 23 de cromozomi diferiți. S-a efectuat un total de nouă rulări folosind trei instrumente de secvențiere, trei loturi de reactivi și trei operatori în cursul a cinci zile de inițiere. Acuratețea a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții comparând rezultatele cu o metodă de referință compusă, bine caracterizată, Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. Regiunile genomice cu grad de încredere au fost definite pe baza acestei metode de referință, dacă nu se specifică altfel.

Tabelul 7 Rezumatul Concordanței de linie germinală

Criterii	Observații totale <sup>1</sup>	Rezultat per observație <sup>2</sup>	Rezultat per rulare <sup>3</sup>
PPA pentru SNV	819	98,7	> 99,9
PPA pentru inserții	819	95,0	98,9
PPA pentru deleții	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Calculate ca număr de probe per rulare (91) x număr de rulări (9) = 819.

<sup>2</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă în toate cele 9 rulări.

<sup>3</sup>Cea mai mică valoare atunci când datele din fiecare rulare sunt analizate colectiv.

**Tabelul 8** conține datele de studiu prezentate cu procentul de concordanță pozitivă și negativă per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu Platinum Genomes versiunea 2016-1.0 pentru calculele PPA. Cele trei tipuri de variante (SNV-uri, inserții și deleții) sunt combinate. Deoarece metoda de referință furnizează rezultate doar pentru variantele mononucleotidice și inserții/deleții, rezultatele privind bazele de non-variante sunt comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19 pentru calculele NPA.

**Tabelul 8** Concordanța de linie germinală per probă

Probă	Indice mediu de definire	Variante preconizate <sup>1</sup>	TP	FN	Variante cu absența definițiilor	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> Numărul total de variante din toate replicările de probe din cele 9 rări.

**Tabelul 9** conține datele de studiu prezentate per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu metoda de referință compusă, bine caracterizată. Detecția este evaluată pentru fiecare tip de variantă – SNV-uri, inserții și deleții – separat. Pozițiile de referință sunt excluse.

**Tabelul 9** Concordanța de linie germinală per probă după tipul de variantă

Probă	SNV-uri			Inserții			Deleții		
	Preconizate	TP	FN	Preconizate	TP	FN	Preconizate	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0

Probă	SNV-uri			Insertii			Deleții		
	Preconizate	TP	FN	Preconizate	TP	FN	Preconizate	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

Probele au fost analizate în continuare pentru definirea de mici insertii și deleții (indeli). Un rezumat de ansamblu este prezentat în [Tabelul 10](#). A existat un total de 71 de indeli, variind ca dimensiuni între 1 și 24 bp pentru insertii și între 1 și 25 bp pentru deleții.

Tabelul 10 Rezumatul detecției de indeli de linie germinală

VARIANTĂ TIP	Variante preconizate	TP	FN	Variante cu absența definițiilor	PPA
Insertie	18522	18018	27	477	99,9
Deleție	17388	17073	0	315	100

Testarea reprezentativă a constat în 150 de ampliconi proiectați să acopere diverse conținuturi genomice. Conținutul GC al ampliconilor a variat între 0,19 și 0,87. De asemenea, ampliconii au avut o gamă de repetări mononucleotidice (de ex., PolyA, PolyT), de dinucleotide și trinucleotide. Datele au fost compilate pentru fiecare amplicon în parte ([Tabelul 11](#)), pentru a determina efectul conținutului genomic asupra procentului de definiții corecte. Procentul de definiții corecte constă în definiții de variante și definiții de referință și este mai mic de 100% dacă există fie definiții incorecte, fie absențe ale definițiilor.

Tabelul 11 Acuratețe Linie germinală la nivel de amplicon

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiții corecte
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Nu se aplică	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nu se aplică	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100



Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Nu se aplică	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Nu se aplică	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	Nu se aplică	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nu se aplică	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Nu se aplică	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Nu se aplică	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Nu se aplică	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nu se aplică	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nu se aplică	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nu se aplică	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Nu se aplică	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Nu se aplică	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
73	11	101347052	101347136	85	85	Nu se aplică	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Nu se aplică	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	Nu se aplică	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nu se aplică	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Nu se aplică	0,36	74529	0	0	100

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nu se aplică	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0.54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nu se aplică	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Nu se aplică	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nu se aplică	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nu se aplică	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Nu se aplică	0,64	57330	0	0	100

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
127	20	746056	746149	94	94	Nu se aplică	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nu se aplică	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Nu se aplică	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Nu se aplică	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	Nu se aplică
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	Nu se aplică
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nu se aplică

Rezultatele de secvențiere pentru proba NA12878 au fost comparate cu un genotip cu grad ridicat de încredere pentru NA12878, stabilit de Institutul național pentru standarde și tehnologie (NIST) (v.2.19). Dintre cei 150 de ampliconi, 92 de ampliconi au fost pe deplin conținuți în regiunile genomice cu grad ridicat de încredere, 41 de ampliconi au avut suprapunere parțială și 17 ampliconi nu au avut nicio suprapunere în secvența NIST. Acest rezultat a determinat 10.000 de coordonate per replicare pentru comparație. Definițiile bazelor de non-variante au fost comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19. Rezultatele privind acuratețea sunt prezentate în [Tabelul 12](#).

Tabelul 12 Concordanța de linie germinală a probei NA12878 cu baza de date NIST

Probă	Nr. ampliconi	Indice mediu de definire	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Pe baza datelor furnizate de acest studiu de linie germinală cu 9 rulări, Instrumentul NextSeq 550Dx poate secvenția în mod consecvent:

- conținut GC  $\geq$  19% (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați, cu 19% conținut GC definit corect, cu o rată de eșec de 0,6%)
- conținut GC  $\leq$  87% (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați, cu 87% conținut GC definit corect, cu o rată de eșec zero)
- lungimi de PolyA  $\leq$  9 (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyA de nouă nucleotide definite corect, cu o rată de eșec zero)
- lungimi de PolyT  $\leq$  10 (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyT de zece nucleotide definite corect, cu o rată de eșec zero)
- lungimi de PolyG  $\leq$  7 (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyG de șapte nucleotide definite corect, cu o rată de eșec de 1,0%)
- lungimi de PolyC  $\leq$  6 (toate bazele definite din 2457 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyC de șase nucleotide definite corect, cu o rată de eșec zero)
- lungimi cu repetări de dinucleotide  $\leq$  11x (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 11x dinucleotide definite corect, cu o rată de eșec de 0,5%)
- lungimi cu repetări de trinucleotide  $\leq$  5x (toate bazele definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 5x trinucleotide definite corect, cu o rată de eșec de 0,5%)
- lungimi cu inserție  $\leq$  24 (66343 dintre cele 66370 de baze definite din 819 ampliconi secvențiați care conțin o inserție de 24 de nucleotide definite corect, cu o rată de eșec de 1,2%; nicio definire incorectă nu a avut loc în regiunea care conține inserția de 24 de nucleotide)
- lungimi cu deleție  $\leq$  25 (toate bazele definite din 2457 de ampliconi secvențiați care conțin o deleție de 25 de nucleotide definite corect, cu o rată de eșec zero)

## Somatic

Studiul descris aici a fost folosit pentru a evalua acuratețea de definire a variantelor a Somatic Variant Module pe Instrumentul NextSeq 550Dx, folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Acest studiu a folosit o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze (150 de ampliconi) din 23 de cromozomi diferiți. ADN Platinum Genome a fost extras din blocurile tratate cu FFPE pentru a genera șase probe unice în scopul evaluării în cadrul studiului.

Proba de ADN GM12877 a fost diluată cu proba de ADN GM12878 pentru a crea GM12877-D5 și GM12877-D7 ca un set de variante heterozigote unice cu frecvențe ale variantelor aproape de 5% și 7%. Proba de ADN GM12878 a fost diluată similar cu proba de ADN GM12877 pentru a crea GM12878-D5 și GM12878-D7. Fiecare dintre probe a fost testată în triplu exemplar, cu excepția probelor diluate, care au fost testate în replicări de câte șase. S-a efectuat un total de nouă rulări folosind trei instrumente de secvențiere, trei loturi de reactivi și trei operatori în cursul a cinci zile de inițiere. Acuratețea a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții comparând rezultatele cu o metodă de referință compusă, bine caracterizată, Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. Regiunile genomice cu grad de încredere au fost definite pe baza acestei metode de referință, dacă nu se specifică altfel.

Tabelul 13 Rezumatul Concordanței somatice

criterii	Observații totale <sup>1</sup>	Rezultat per observație <sup>2</sup>	Rezultat per rulare <sup>3</sup>
PPA pentru SNV	378	98,9	99,9
PPA pentru inserții	378	96,9	99,9
PPA pentru deleții	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Calculate ca număr de probe per rulare (42) x număr de rulări (9) = 378.

<sup>2</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă în toate cele 9 rulări.

<sup>3</sup>Cea mai mică valoare atunci când datele din fiecare rulare sunt analizate colectiv.

Tabelul 14 conține datele de studiu prezentate cu procentul de concordanță pozitivă și negativă per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu metoda de referință compusă, bine caracterizată pentru calculele PPA. Cele trei tipuri de variante (SNV-uri, inserții și deleții) sunt combinate. Deoarece metoda de referință furnizează rezultate doar pentru variantele mononucleotidice și inserții/deleții, rezultatele privind bazele de non-variante sunt comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19 pentru calculele NPA.

Tabelul 14 Concordanța somatică per probă

Probă	Indice mediu de definire	Preconizate	TP	FN	Variante cu absența definirilor	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

Probă	Indice mediu de definire	Preconizate	TP	FN	Variante cu absența definițiilor	TN	FP	PPA	NPA	OPA
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

Tabelul 15 conține datele de studiu prezentate per probă, unde rezultatele privind variantele sunt comparate cu metoda de referință compusă, bine caracterizată. Detecția este evaluată pentru fiecare tip de variantă – SNV-uri, inserții și deleții – separat. Pozițiile de referință sunt excluse.

Tabelul 15 Concordanța somatică per probă după tipul de variantă

Probă	SNV-uri			Inserții			Deleții		
	Preconizate	TP	FN	Preconizate	TP	FN	Preconizate	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Cele zece probe au fost analizate în continuare pentru definirea de mici inserții și deleții (indeli) (Tabelul 16). A existat un total de 71 de indeli, variind ca dimensiuni între 1 și 24 bp pentru inserții și între 1 și 25 bp pentru deleții.



Tabelul 16 Rezumatul detecției de indeli somatici

Tip de variantă	Variante preconizate	TP	FN	Variante cu absența definițiilor	PPA
Insertie	10773	10282	9	482	99,2
Deleție	11502	10667	5	830	> 99,9

Cei 150 de ampliconi au fost proiectați să acopere diverse conținuturi genomice. Conținutul GC al ampliconilor a variat între 0,19% și 0,87%. De asemenea, ampliconii au avut o gamă de repetări mononucleotidice (de ex., PolyA, PolyT), de dinucleotide și trinucleotide. Datele au fost compilate pentru fiecare amplicon în parte (**Tabelul 17**), pentru a determina efectul conținutului genomic asupra procentului de definiri corecte. Procentul de definiri corecte constă în definiri de variante și definiri de referință și este mai mic de 100% dacă există fie definiri incorecte, fie absențe ale definițiilor.

Tabelul 17 Acuratețe somatică la nivel de amplicon

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Nu se aplică	0,65	30616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Nu se aplică	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nu se aplică	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Nu se aplică	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Nu se aplică	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	Nu se aplică	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Nu se aplică	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definirilor	% definiri corecte
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Nu se aplică	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Nu se aplică	0,42	31365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Nu se aplică	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Nu se aplică	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Nu se aplică	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Nu se aplică	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Nu se aplică	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Nu se aplică	0,59	38546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
73	11	101347052	101347136	85	85	Nu se aplică	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Nu se aplică	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	Nu se aplică	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Nu se aplică	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Nu se aplică	0,36	34286	0	112	99,7

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definițiilor	% definiri corecte
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Nu se aplică	0,27	23809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Nu se aplică	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Nu se aplică	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Nu se aplică	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Nu se aplică	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Nu se aplică	0,64	26442	0	26	99,9

Amplicon	Cromozom	Început amplicon	Sfârșit amplicon	Dimensiunea fragmentului analizat	Baze în regiuni de încredere	Conținut genomic amplicon	Conținut GC	Definiri corecte	Definiri incorecte	Absențe ale definirilor	% definiri corecte
127	20	746056	746149	94	94	Nu se aplică	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Nu se aplică	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Nu se aplică	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Nu se aplică	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nu se aplică	0,55	0	0	0	Nu se aplică
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nu se aplică	0,48	0	0	0	Nu se aplică
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nu se aplică

Rezultatele de secvențiere pentru proba GM12878 au fost comparate cu un genotip cu grad ridicat de încredere pentru NA12878, stabilit de Institutul național pentru standarde și tehnologie (NIST) (v.2.19). Dintre cei 150 de ampliconi, 92 de ampliconi au fost pe deplin conținuți în regiunile genomice cu grad ridicat de încredere, 41 de ampliconi au avut suprapunere parțială și 17 ampliconi nu au avut nicio suprapunere în secvența NIST. Acest rezultat a determinat 10.000 de coordonate per replicare pentru comparație. Definițiile bazelor de non-variante au fost comparate cu versiunea de secvență de referință a genomului uman hg19. Rezultatele privind acuratețea sunt prezentate în [Tabelul 18](#).

Tabelul 18 Concordanța somatică a probei GM12878 cu baza de date NIST

Probă	Nr. ampliconi	Indice mediu de definire	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Pe baza datelor furnizate de acest studiu somatic cu nouă rulări, Instrumentul NextSeq 550Dx poate secvenția în mod consecvent:

- conținut GC  $\geq$  19% (toate bazele definite din 378 ampliconi secvențiați, cu 19% conținut GC definit corect, cu o rată de absență a definirii de 2,6%)
- conținut GC  $\leq$  87% (toate bazele definite din 378 de ampliconi secvențiați, cu 87% conținut GC definit corect, cu o rată de absență a definirii de 0,6%)
- lungimi de PolyA  $\leq$  9 (toate bazele definite din 378 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyA de nouă nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 2,5%)
- lungimi de PolyT  $\leq$  10 (toate bazele definite din 378 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyT de zece nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii mai mică de 0,1%)
- lungimi de PolyG  $\leq$  6 (toate bazele definite din 2268 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyG de șase nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,5%)
- lungimi de PolyC  $\leq$  6 (toate bazele definite din 756 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare PolyC de șase nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,4%)
- lungimi cu repetări de dinucleotide  $\leq$  4x (toate bazele definite din 1890 de ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 4x dinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,9%)
- lungimi cu repetări de trinucleotide  $\leq$  5x (toate bazele definite din 378 ampliconi secvențiați care conțin o repetare de 5x trinucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 1,4%)
- lungimi cu inserție  $\leq$  23 (toate bazele definite din 378 de ampliconi secvențiați care conțin o inserție de 23 de nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,8%)
- lungimi cu deleție  $\leq$  25 (toate bazele definite din 1134 de ampliconi secvențiați care conțin o deleție de 25 de nucleotide definite corect, cu o rată de absență a definirii de 0,7%)



## Precizie

Precizia Instrumentul NextSeq 550Dx a fost determinată prin testarea a 13 probe unice Platinum Genome folosind trei instrumente, trei loturi de reactivi și trei operatori pentru a genera nouă rulări de secvențiere în cursul a cinci zile de inițiere. Testarea reprezentativă, probele și metoda de referință sunt aceleași cu cele descrise pentru studiul privind acuratețea liniei germinale. Contribuțiile la precizie au fost determinate prin analiza componentelor varianței, folosind VAF ca variabila de răspuns și calculând abaterile standard la nivel de componentă pentru instrument, lot de reactivi, operator și zi de inițiere (Tabelul 19). Numărul total de observații folosit în analiza pentru fiecare componentă a variabilității instrumentului, operatorului sau lotului de reactivi a fost de 699, 176 și 235 pentru SNV-uri, inserții și, respectiv, deleții.

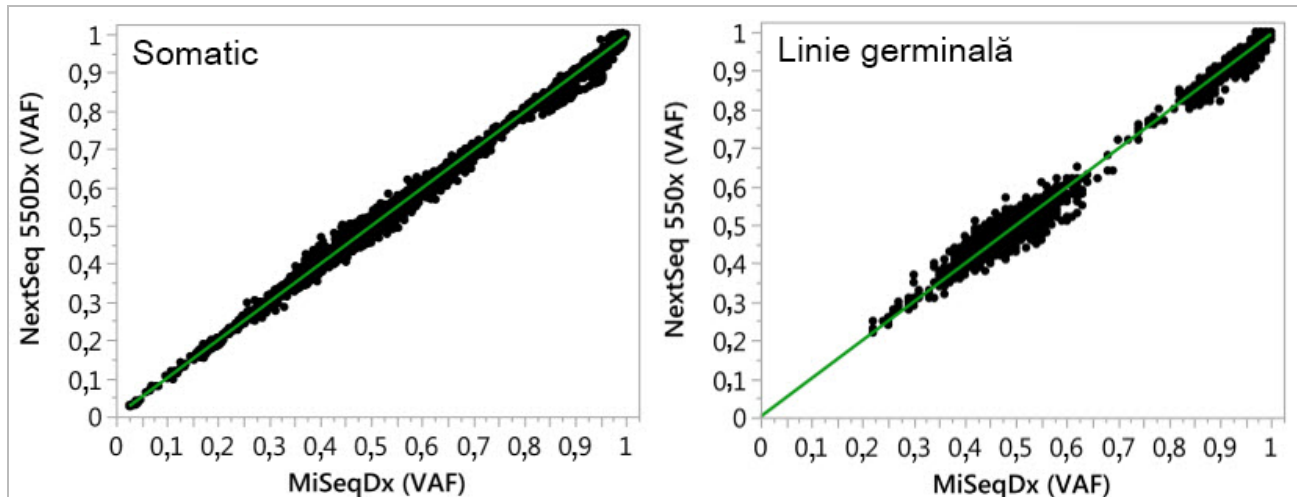
Tabelul 19 Rezultate de precizie pentru instrumentul NextSeq 550Dx (abatere standard)

Componentă	Tip de variantă	AS componentă		AS totală	
		Max	Median	Max	Median
Lot	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inserție	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deleție	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inserție	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deleție	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operator	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inserție	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deleție	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Zi	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inserție	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deleție	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

## Compararea metodelor (platforma de secvențiere)

Probele de sânge integral și FFPE au fost evaluate pe Instrumentul NextSeq 550Dx și pe instrumentul MiSeqDx, folosind fluxurile de lucru de linie germinală și somatice cu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Concordanța frecvenței variantelor pentru probele de sânge și FFPE a fost evaluată folosind multiple testări reprezentative. [Figura 2](#) reprezintă grafic corelația VAF între cele două instrumente pentru o testare reprezentativă și [Tabelul 20](#) rezumă această corelație cu ajutorul panoului de testare. Pe baza puternicei corelații între instrumentul MiSeqDx și Instrumentul NextSeq 550Dx, caracteristicile de performanță aferente factorilor preanalitici (de ex., metodele de extracție sau substanțele interferente) sunt determinate ca aplicabile ambelor instrumente. Consultați prospectul pentru TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pentru detalii suplimentare.

Figura 2 Corelația VAF între Instrumentele MiSeqDx și NextSeq 550Dx pentru probele FFPE (stânga) și Sânge (dreapta) folosind testarea 1



Tabelul 20 Rezultatele comparării metodelor folosind probe de sânge și FFPE unice

Sursa de ADNg	Testare (panou de oligoelemente)	Replicări biologice (probe)	Replicări tehnice (per probă)	Observații (nr. de variante)	Pantă	Interceptare	Corelație (R <sup>2</sup> )
Sânge	Testarea 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Sânge	Testarea 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Testarea 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Testarea 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>Au fost eliminate două puncte de date pe baza limitării precizate pentru Germline Variant Module.

<sup>2</sup>Coeficientul de determinare pentru VAF are reprezentarea grafică ilustrată în Figura 2.

## Reproductibilitate

Reproductibilitatea Instrumentul NextSeq 550Dx a fost evaluată folosind probe Platinum Genome cu o testare reprezentativă concepută să interogheze o varietate de gene acoperind 12.588 de baze din 23 de cromozomi diferiți, folosind 150 de ampliconi. Testarea de linie germinală a constat din șapte replicări de 13 probe; testarea somatică a constat din șase replicări de șapte probe la diferite niveluri VAF. Probele au fost pregătite folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testarea a fost realizată în trei centre externe, folosind un lot de seturi de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Un singur instrument NextSeq 550Dx a fost folosit în fiecare centru. Doi operatori au desfășurat testarea în fiecare centru. Fiecare operator a realizat testarea în trei zile de inițiere neconsecutive pentru fiecare tip de probă pentru un total de 36 de rulări în cele trei centre. Această testare a rezultat în 18 rulări pentru fiecare flux de lucru – de linie germinală și somatic.

## Linie germinală

Variantele de linie germinală cu nivel VAF  $\geq 0,2$  sunt raportate ca pozitive (variantă). Pentru variantele de linie germinală pozitive preconizate, datele au fost evaluate pentru rata absenței definirii și indicele de definiri pozitive corecte în cadrul fiecărui tip de variantă (SNV, inserție, deleție). [Tabelul 21](#) rezumă ratele observate, împreună cu nivelurile inferior și superior (LCL/UCL) pentru intervalul de încredere 95%, calculate folosind metoda Wilson Score, pentru fiecare tip de variantă.

Tabelul 21 Observații privind definirea de linie germinală pentru rezultatele pozitive preconizate, după tipul de variantă

Tip de variantă	Absența definirilor			Definire pozitivă corectă			LCL 95%	UCL 95%
	Observată	Totală	Procent	Observată	Totală	Procent		
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Inserții	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Deleții	648	34,776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Variantele de linie germinală cu nivel VAF  $< 0,2$  sunt raportate ca negative (de tip sălbatic). Pentru locațiile de linie germinală negative preconizate, datele au fost evaluate pentru rata de absențe de definiri și indicele de definiri corecte de tip sălbatic. [Tabelul 22](#) rezumă ratele observate, împreună cu nivelurile inferior și superior (LCL/UCL) ale intervalului de încredere 95%, calculate folosind metoda Wilson Score.

Tabelul 22 Observații privind definirea de linie germinală pentru rezultatele negative preconizate

Tip de variantă	Absența definirilor			Definire negativă corectă			LCL 95%	UCL 95%
	Observată	Totală	Procent	Observată	Totală	Procent		
Tip sălbatic	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Variantele de linie germinală cu nivel VAF  $\geq 0,2$  și  $< 0,7$  sunt definite ca heterozigote pozitive pentru variantă, iar variantele cu nivel VAF  $\geq 0,7$  sunt definite ca homozigote pozitive pentru variantă. Probele cu variante heterozigote au fost folosite pentru a determina dacă variabilitatea inerentă a testării ar afecta definirea genotipurilor. Cx a fost determinată pentru ambele limite (0,2 pentru genotipurile heterozigote și 0,7 pentru genotipurile homozigote), unde x este proporția de teste repetate care depășesc limita. Pentru limita inferioară de 0,2 VAF, Cx a fost  $\geq 99,999\%$ , indicând că  $\geq 99,999\%$  din variantele heterozigote vor fi definite ca heterozigote. Pentru limita superioară de 0,7 VAF, Cx a fost  $\leq 0,001\%$ , indicând așadar că  $\leq 0,001\%$  din variantele heterozigote vor fi definite ca homozigote. [Tabelul 23](#) rezumă rezultatele după tipul de variantă.

Variantele de linie germinală cu nivel VAF  $\geq 0,2$  și  $< 0,7$  sunt definite ca heterozigote pozitive pentru variantă, iar variantele cu nivel VAF  $\geq 0,7$  sunt definite ca homozigote pozitive pentru variantă. Probele cu variante heterozigote au fost folosite pentru a determina dacă variabilitatea inerentă a testării ar afecta definirea genotipurilor. Cx a fost determinată pentru ambele limite (0,2 pentru genotipurile heterozigote și 0,7 pentru genotipurile homozigote), unde x este proporția de teste repetate care depășesc limita. Pentru limita inferioară

de 0,2 VAF, Cx a fost  $\geq 99,999\%$ , indicând așadar că  $\geq 99,999\%$  din variantele heterozigote vor fi definite ca heterozigote. Pentru limita superioară de 0,7 VAF, Cx a fost  $\leq 0,001\%$ , indicând că  $\leq 0,001\%$  din variantele heterozigote vor fi definite ca homozigote. [Tabelul 23](#) rezumă rezultatele după tipul de variantă.

Tabelul 23 Valorile Cx de linie germinală pentru variantele heterozigote

Tip de variantă	Limită la 0,2 VAF	Limită la 0,7 VAF
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insertii	24/24	24/24
Deleții	35/35	35/35
Totală	153	153

## Somatic

Variantele somatice cu niveluri VAF  $\geq 0,026$  sunt raportate ca pozitive (variantă). Observațiile cu niveluri VAF  $\geq 0,01$  și  $< 0,026$  au fost considerate echivoce în scopul acestei analize (nici pozitive, nici negative, semnalizate ca frecvență redusă a variantelor). Pentru a evalua performanța, rezultatele au fost calculate în trei moduri:

- Cazul cel mai favorabil: orice rezultat echivoc a fost considerat o definire pozitivă corectă (concordanță cu rezultatele preconizate)
- Cazul cel mai nefavorabil: orice rezultat echivoc a fost considerat o definire incorectă (neconcordanță cu rezultatele preconizate)
- Cazul de excludere: orice rezultat echivoc a fost exclus din analiză

Trei tabele, [Tabelul 24](#), [Tabelul 25](#) și [Tabelul 26](#), prezintă pe scurt rezultatele definirilor pentru cazul cel mai favorabil, cazul cel mai nefavorabil și, respectiv, cazul de excludere, împreună cu nivelurile inferior și superior (LCL/UCL) ale intervalului de încredere 95%, calculate folosind metoda Wilson Score.

Tabelul 24 Observații privind definirea somatică pentru rezultatele pozitive preconizate, după tipul de variantă (Cazul cel mai favorabil)

Tip de variantă	Definire pozitivă corectă				
	Observată	Totală	Procent	LCL 95%	UCL 95%
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertii	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Deleții	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabelul 25 Observații privind definirea somatică pentru rezultatele pozitive preconizate, după tipul de variantă (Cazul cel mai nefavorabil)

Tip de variantă	Definire pozitivă corectă				
	Observată	Totală	Procent	LCL 95%	UCL 95%
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertții	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Deleții	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabelul 26 Observații privind definirea somatică pentru rezultatele pozitive preconizate, după tipul de variantă (Cazurile echivoce eliminate)

Tip de variantă	Definire pozitivă corectă				
	Observată	Totală	Procent	LCL 95%	UCL 95%
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertții	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Deleții	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Variantele somatice cu nivel VAF < 0,01 sunt raportate ca definiri negative (de tip sălbatic). Pentru locațiile somatice negative preconizate, datele au fost evaluate pentru rata de absențe de definiri și indicele de definiri corecte de tip sălbatic. Definirile corecte de tip sălbatic au fost determinate excluzând absențele definirilor și scăzând definirile observate care se încadrează în zona echivocă (niveluri VAF  $\geq 0,01$  și < 0,026), precum și definirile incorecte situate deasupra limitei (niveluri VAF  $\geq 0,026$ ) din total. [Tabelul 27](#) rezumă rezultatele observate, totale și procentuale pentru locațiile somatice negative pentru rata de absențe de definiri și rata de definiri corecte de tip sălbatic împreună cu nivelurile inferior și superior (LCL/UCL) ale intervalului de încredere 95%, calculate folosind metoda Wilson Score.

Tabelul 27 Observații privind definirea somatică pentru rezultatele negative preconizate

Varianta Tip	Absența definirilor			Definire corectă						
	Observată	Totală	Procent	Echivocă	Incorectă	Corectă	Totală	Procent	LCL 95%	UCL 95%
Tip sălbatic	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Probele somatice la niveluri VAF diferite pentru aceeași variantă au fost evaluate pentru a determina valoarea C95 pentru testare (în cadrul fiecărui tip de variantă). Pentru a evalua variabilitatea aproape de limita de testare, au fost folosite probele care aveau nivelurile VAF preconizate între 0,02 și 0,07. Valoarea C95 a fost determinată pentru fiecare variantă, cu cea mai mare valoare C95 pentru fiecare tip de variantă raportată în [Tabelul 28](#).

Tabelul 28 Rezumat somatic C95

Tip de variantă	N	C95
-----------------	---	-----

SNV	74	0,0613
Insertie	24	0,0573
Deletie	33	0,0575

## Performanța NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles)

### Prezentare generală

NextSeq 550Dx este acceptat de două seturi de reactivi: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Pentru a demonstra că NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) poate îndeplini cerințele de performanță analitică verificate și validate cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), au fost realizate studii cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Au fost efectuate două pregătiri de biblioteci folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, una cu fluxul de lucru Germline și alta cu fluxul de lucru Somatic. Bibliotecile din fiecare flux de lucru au fost testate cu trei loturi de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), folosind trei instrumente NextSeq 550Dx. În plus, testarea pentru fiecare flux de lucru a inclus o singură rulare cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

### Sensibilitate analitică (Limită de blanc [LoB] și Limită de detecție [LoD])

Verificarea cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) a demonstrat că Instrumentul NextSeq 550Dx poate detecta variante la 0,05 VAF cu o eroare de Tip II  $\leq 0,05$  și că limita VAF de 0,026 folosită de Somatic Variant Module (LoB efectivă) acceptă o eroare de Tip I  $\leq 0,01$ . Pe baza acestor afirmații, se preconizează că o variantă la 0,05 VAF este mai mare sau egală cu 0,026 VAF 95% din timp și că o poziție de tip sălbatic este mai mică decât 0,026 VAF 99% din timp. Pentru a se asigura faptul că aceste afirmații au fost îndeplinite cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), s-au efectuat măsurări repetate pe instrumentul NextSeq 550Dx cu probe de tip sălbatic (probe LoB) și cu probe conținând variante la 0,05 VAF (probe LoD), folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Proporția de definiții peste și sub limita de 0,026 a fost apoi comparată cu afirmațiile stabilite cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Testarea a inclus două probe LoD, fiecare cu un set unic de variante vizate la 0,05 VAF și probe LoB corespunzătoare care au fost de tip sălbatic pentru variantele vizate. Pentru pregătirea bibliotecilor, probele LoD și LoB au fost procesate în replicări de opt, respectiv șapte, folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Bibliotecile au fost secvențiate inițial folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) pentru a identifica variantele/coordonatele genomice pentru evaluarea LoB/LoD cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Toate variantele cu VAF medie între 0,045 și 0,055 (variantele LoD) bazate pe rezultatele din NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) au fost folosite pentru analiza LoD (N = 51 de variante). Pentru analiza LoB au fost evaluate cele 51 de coordonate genomice corespunzătoare.

Pentru evaluarea NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), bibliotecile au fost secvențiate în trei rulări timp de trei zile de inițiere consecutive, folosind același instrument și același lot de set de reactivi. Această testare a generat 24 de replicări pentru fiecare dintre cele 51 de variante LoD și 21 de replicări pentru fiecare dintre pozițiile de tip sălbatic corespunzătoare. Proporția de definiții de tip sălbatic cu VAF < 0,026 este furnizată în [Tabelul 29](#). Proporția de definiții de variante LoD cu VAF mai mare sau egal cu 0,026 este furnizată în [Tabelul 30](#).

Tabelul 29 Proporția de definiții < 0,026 pentru pozițiile de tip sălbatic (evaluarea afirmațiilor LoB)

Variantă Tip	Poziții evaluate	Observații totale	Nr. de măsurări VAF ≥ 2,6%	Proporție < 2,6%	Proporție 95% Interval de încredere
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Insertie	11	231	0	1	0,984 – 1
Deleție	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabelul 30 Proporția de definiții ≥ 0,026 VAF pentru variantele LoD (evaluarea afirmațiilor LoD)

Variantă Tip	Poziții evaluate	Observații totale	Nr. de măsurări VAF < 2,6%	Nr. de măsurări VAF ≥ 2,6%	Proporție ≥ 2,6%	Proporție 95% Interval de încredere
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Insertie	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Deleție	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

## Acuratețe

### Linie germinală

Studiul următor a fost realizat pentru a evalua acuratețea de definire a variantelor cu Germline Variant Module folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Douăsprezece probe unice Platinum Genome au fost testate folosind o testare reprezentativă. S-a efectuat un total de 11 rulări folosind trei instrumente NextSeq 550Dx și trei seturi NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Acuratețea a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții comparând rezultatele cu o metodă de referință compusă, bine caracterizată, Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. Rezultatele privind acuratețea dintr-o singură rulare de secvențiere folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sunt furnizate cu titlu orientativ. Un rezumat al rezultatelor este furnizat în [Tabelul 31](#).

Tabelul 31 Rezumatul Concordanței de linie germinală

criterii	Observații totale (v2.5) <sup>1</sup>	Rezultat per observație (v2.5) <sup>2</sup>	Rezultat per observație (v2) <sup>3</sup>	Rezultat per rulare (v2.5) <sup>4</sup>	Rezultat per rulare (v2) <sup>4</sup>
PPA pentru SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA pentru inserții	1056	100	100	100	100
PPA pentru deleții	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>Calculate ca număr de probe per rulare x număr de rulări (96 de probe per rulare x 11 rulări = 1056 de observații).

<sup>2</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă în toate rulările (pe baza a 11 rulări pentru NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă într-o rulare (96 de observații totale).

<sup>4</sup> Cea mai mică valoare atunci când datele din fiecare rulare sunt analizate colectiv.

## Somatic

Studiul următor a fost realizat pentru a evalua acuratețea de definire a variantelor a Somatic Variant Module pe instrumentul NextSeq 550Dx, folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Zece probe Platinum Genome FFPE (două cu variantele diluate la 0,05 VAF) au fost testate folosind o testare reprezentativă. S-a efectuat un total de 11 rulări folosind trei instrumente NextSeq 550Dx și trei loturi de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Acuratețea a fost determinată pentru SNV-uri, inserții și deleții comparând rezultatele cu o metodă de referință compusă, bine caracterizată, Platinum Genomes versiunea 2016-1.0. Rezultatele privind acuratețea dintr-o singură rulare de secvențiere folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sunt furnizate cu titlu orientativ. Un rezumat al rezultatelor este furnizat în [Tabelul 32](#).

Tabelul 32 Rezumatul Concordanței somatice

Criterii	Observații totale (v2.5) <sup>1</sup>	Rezultat per observație (v2.5) <sup>2</sup>	Rezultat per observație (v2) <sup>3</sup>	Rezultat per rulare (v2.5) <sup>4</sup>	Rezultat per rulare (v2) <sup>4</sup>
PPA pentru SNV	528	100	100	100	100
PPA pentru inserții	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA pentru deleții	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>Calculate ca număr de probe per rulare x număr de rulări (48 de probe per rulare x 11 rulări = 528 de observații).

<sup>2</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă în toate rulările (pe baza a 11 rulări pentru NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Cea mai mică valoare observată per replicare de probă într-o rulare (96 de observații totale).

<sup>4</sup>Cea mai mică valoare atunci când datele din fiecare rulare sunt analizate colectiv.

## Precizie

### Linie germinală

Precizia NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) cu Germline Variant Module a fost evaluată folosind probe Platinum Genome și o testare reprezentativă. Testarea a constat din pregătirea unei singure biblioteci folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx și a inclus 12 probe procesate cu câte opt replicări fiecare. Bibliotecile au fost secvențiate cu trei loturi din NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) și trei instrumente NextSeq 550Dx pentru un total de nouă rulări de secvențiere.

Probele cu variante heterozigote au fost folosite pentru a determina dacă variabilitatea inerentă a testării ar afecta definirea genotipurilor (N = 153 de variante heterozigote unice). Cx a fost determinată pentru ambele limite ale Germline Variant Module (0,2 pentru genotipurile heterozigote și 0,7 pentru genotipurile homozigote), unde x este proporția de teste repetate care depășesc limita. Pentru limita inferioară de 0,2 VAF, varianta cu Cx minimă pentru NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) a fost > 99,9%, indicând că > 99,9% din variantele heterozigote vor fi definite ca heterozigote. Pentru limita superioară de 0,7 VAF, varianta cu Cx maximă pentru NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) a fost < 1,5%, indicând că ≤ 1,5% din variantele heterozigote vor fi definite ca homozigote. [Tabelul 33](#) rezumă rezultatele după tipul de variantă. Valorile Cx dintr-o singură rulare de secvențiere folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sunt furnizate cu titlu orientativ.

Tabelul 33 Valorile Cx de linie germinală pentru variantele heterozigote

Tip de variantă	N	Limită la 0,2 VAF		Limită la 0,7 VAF	
		Cx min. (v2.5) <sup>1</sup>	Cx min. (v2) <sup>2</sup>	Cx max. (v2.5) <sup>1</sup>	Cx max. (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	> 99,9%	> 99,9%	1,5%	1,0%
Insertii	24	100%	100%	0%	< 0,1
Deleții	35	100%	> 99,9%	< 0,1	< 0,1

<sup>1</sup>Valori Cx bazate pe estimările de Abatere standard totală din analiza componentelor varianței.

<sup>2</sup>Valori Cx bazate pe Abaterile standard ale eşantioanelor.

## Somatic

Precizia NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) cu Somatic Variant Module a fost evaluată folosind probe Platinum Genome FFPE și o testare reprezentativă. Testarea a constat din pregătirea unei singure biblioteci folosind TruSeq Custom Amplicon Kit Dx și a inclus două probe cu câte opt replicări fiecare. Bibliotecile au fost secvențiate folosind trei loturi din NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) și trei instrumente NextSeq 550Dx pentru un total de nouă rulări de secvențiere.

Variantele somatice cu niveluri VAF preconizate  $\leq 0,10$  VAF (N = 131 de variante unice) au fost folosite pentru a evalua variabilitatea instrumentului aproape de limita VAF a Somatic Variant Module (variantele somatice cu nivelul VAF  $\geq 0,026$  sunt denumite pozitive pentru variantă). Valorile C95 au fost determinate pentru fiecare dintre variantele somatice. Valorile C95 reprezintă VAF la care probabilitatea de a fi mai mare decât limita VAF a Somatic Variant Module este de 95%. Cele mai mari valori C95 după tipul de variantă sunt raportate în [Tabelul 34](#). Rezultatele C95 dintr-o singură rulare de secvențiere folosind NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) sunt furnizate cu titlu orientativ.

Tabelul 34 Rezumat somatic C95

Tip de variantă	Nr. de variante evaluate	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Insertii	24	0,062	0,061
Deleții	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>Valori C95 bazate pe estimările de Abatere standard totală din analiza componentelor varianței.

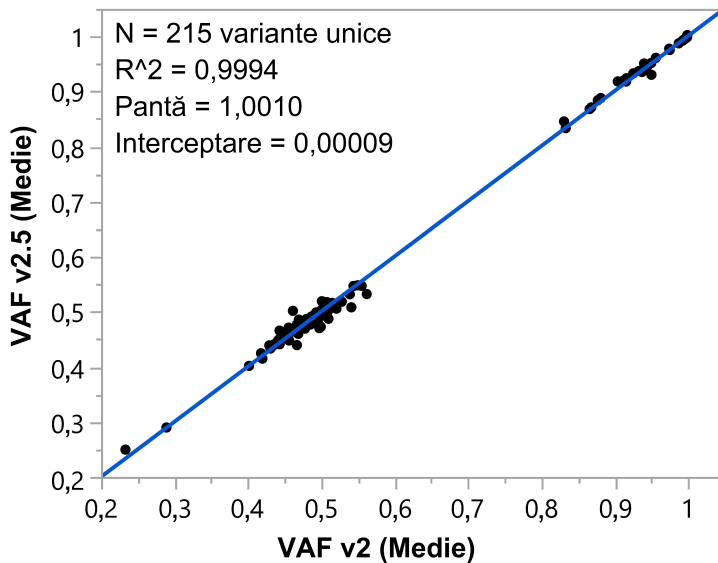
<sup>2</sup>Valori C95 bazate pe Abaterile standard ale eșantioanelor.

## Compararea metodelor (set de reactivi)

### Linie germinală

Frecvențele VAF medii pentru 215 variante unice au fost evaluate cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), folosind rezultatele generate de Germline Variant Module. Mediile VAF au fost calculate pe baza a 11 rulări de secvențiere (v2.5) și a unei rulări de secvențiere (v2). Cel puțin opt replicări au fost folosite pentru a calcula media pentru fiecare variantă. [Figura 3](#) reprezintă grafic corelația VAF între cele două seturi de reactivi. Pe baza puternicei corelații liniare VAF și a similarității rezultatelor între seturile de reactivi, caracteristicile de performanță verificate și validate inițial cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) cu Germline Variant Module sunt determinate ca aplicabile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figura 3 Corelația frecvenței alelice a variantelor (VAF) pentru Germline Variant Module între NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

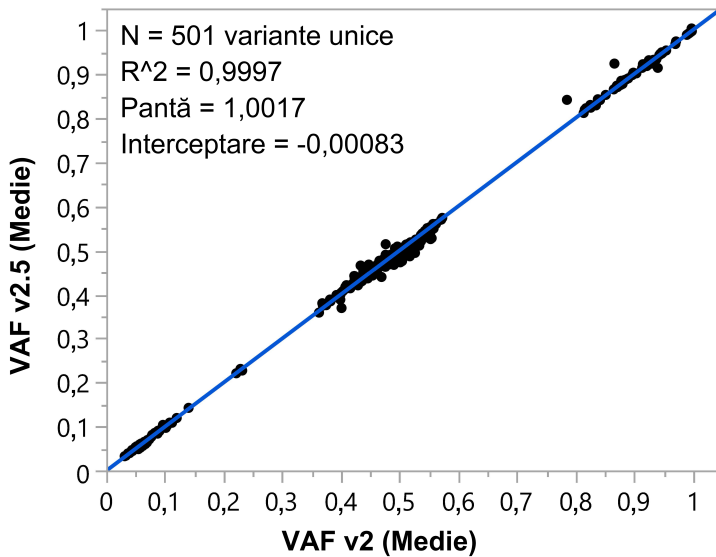


## Somatic

Frecvențele VAF medii pentru 501 variante unice au fost evaluate cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), folosind rezultatele generate de Somatic Variant Module. Mediile VAF au fost calculate pe baza a 11 rulări de secvențiere (v2.5) și a unei rulări de secvențiere (v2). Cel puțin trei replicări au fost folosite pentru a calcula media pentru fiecare variantă unică.

Figura 4 reprezintă grafic corelația VAF între cele două seturi de reactivi. Pe baza corelației VAF și a similarității rezultatelor între seturile de reactivi, caracteristicile de performanță verificate și validate cu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) cu Somatic Variant Module sunt determinate ca aplicabile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figura 4 Corelația frecvenței alelice a variantelor (VAF) pentru Somatic Variant Module între NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) și NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



## Istoricul versiunilor

Document	Data	Descrierea modificării
Document nr. 200031448 v00	Iunie 2023	<p>Versiunea inițială.                      Documentul anterior 1000000030326 înlocuit cu acesta.                      Modificări de la documentul 1000000030326 v6 la acest nou document:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>S-a adăugat conținut pentru a accepta serverul opțional Illumina DRAGEN pentru NextSeq 550Dx.</li> <li>S-a actualizat numărul de componentă pentru filtrul de aer.</li> </ul> <p>Modificări aduse anterior documentului 1000000030326:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Actualizări efectuate pentru a rectifica conținutul adăugat accidental din software-ul sursă.</li> <li>S-a adăugat mențiunea „Avertismente și precauții” privind raportarea incidentelor grave.</li> <li>S-a adăugat la Principiile procedurii o declarație care precizează utilizatorul vizat.</li> <li>S-a eliminat referința la High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).</li> <li>S-a adăugat referința la High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).</li> <li>S-a adăugat tabelul Istoricul reviziilor. S-a actualizat adresa Reprezentantului autorizat în Comunitatea Europeană.</li> </ul>

## Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, al mărcilor sale comerciale, al drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricărui terți prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

NERESPECTAREA OBLIGAȚIEI DE A CITI COMPLET ȘI DE A RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

© 2023 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informații de contact



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 S.U.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



### Sponsor australian

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

## Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile afișate pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor la adresa [support.illumina.com](http://support.illumina.com) în fila *Documentation* (Documentație) corespunzătoare setului dvs.