

Přiložená dokumentace

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO. POUZE PRO EXPORT.

Katalogové č. 20005715

Zamýšlený účel

Přístroj NextSeq 550Dx je určen k sekvenování DNA knihoven s využitím diagnostických testů *in vitro*. Přístroj NextSeq 550Dx je třeba používat s určitými registrovanými, certifikovanými nebo schválenými *in vitro* diagnostickými reagensy a analytickým softwarem.

Principy postupu

Illumina Přístroj NextSeq 550Dx je určen k sekvenování DNA knihoven s využitím diagnostických testů *in vitro* a je určen k použití kvalifikovaným a vyškoleným klinickým laboratorním personálem, který je vyškolen v používání diagnostických postupů *in vitro* prováděných v klinické laboratoři. Jako vstup používá NextSeq 550Dx knihovny připravené z DNA, kdy se indexy vzorků a zachycené sekvence připojují k amplifikovaným cílům. Knihovny vzorků se zachytí v průtokové kyvetě a jsou přístrojem sekvenovány pomocí chemikálií pro technologii SBS (Sequencing by synthesis). Technologie SBS využívá metodu reverzibilního terminátoru k detekci fluorescenčně značených jednotlivých nukleotidových bází při jejich začleňování do rostoucích řetězců DNA. Software pro analýzu v reálném čase (Real-Time Analysis, RTA) provádí analýzu snímků a přiřazení bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přidělí kvalitativní skóre. Když je primární analýza dokončena, lze přístrojem provést sekundární analýzu, která zpracuje přiřazení bází. V závislosti na pracovním postupu využívá NextSeq 550Dx pro sekundární analýzu různé moduly. U modulů pro analýzu germinálních nebo somatických variant zahrnuje zpracování demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, přiřazení variant a generování souborů ve formátu přiřazení variant (VCF a gVCF). Soubory VCF a gVCF obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu.

Konfigurace s duálním bootováním

NextSeq 550Dx zahrnuje konfiguraci s duálním bootováním, která umožňuje použití přístroje buď v diagnostickém režimu (Dx), nebo pouze pro účely výzkumu (RUO). *In vitro* diagnostické sekvenční testy, zahrnující moduly pro analýzu germinálních a somatických variant, se provádějí v diagnostickém režimu. V diagnostickém režimu lze použít pouze reagensie pro sekvenování IVD. Charakteristiky funkčnosti a omezení procedury přístroje NextSeq 550Dx byly stanoveny v diagnostickém režimu za použití modulů pro analýzu germinálních a somatických variant.

Omezení postupu

1. Určeno k diagnostice *in vitro*.
2. Když se moduly pro analýzu germinálních a somatických variant používají se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) nebo se sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů), dokážou zajistit:
 - Výkon sekvenování ≥ 90 gigabází (Gb)
 - Délka čtení (v běhu s párovými konci) 2×150 párů bází (bp)
 - Při délce čtení 2×150 bp se báze se rovnají nebo jsou větší než $Q30 \geq 75 \%$
Báze rovné nebo větší než 75% mají kvalitativní skóre Phred ≥ 30 , což znamená, že přesnost přiřazení bází je větší než $99,9 \%$
3. Čtení s indely (inzercemi, delecemi nebo jejich kombinacemi), kde je délka obsahu > 25 bp software testu neseřadí. Proto indely o délce > 25 bp nejsou pro software testu zjištělné.
4. Software testu nemusí seřadit čtení ampliconů s extrémním obsahem variant, což může vyústit v to, že oblast bude vykázána jako divoký typ. Takový extrémní obsah zahrnuje:
 - Čtení obsahující více než tři indely
 - Čtení o délce alespoň 30 bp s obsahem jednonukleotidové varianty (SNV) $> 4 \%$ celkové cílové délky ampliconu (vyjma oblastí sondy)
 - Čtení o délce < 30 bp s obsahem SNV $> 10 \%$ celkové délky ampliconu (včetně oblastí sondy)
5. Velké varianty, včetně vícenukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné menší varianty.
6. Varianty delecí mohou být při přemostění dvou překrývajících se ampliconů filtrovány nebo opomenuty, je-li délka delece větší než překryv mezi překrývajícími se amplicony, nebo se mu rovná.
7. Systém nedokáže detekovat indely, pokud sousedí přímo s primerem a není zde žádný překrývající se amplicon. U oblastí s překrývajícími se amplicony test nedokáže detekovat delece, pokud je oblast překrytí menší než velikost delece, která se má detekovat. Pokud například oblast překrytí dvou sousedících ampliconů zahrnuje dvě báze, test nedokáže detekovat žádné delece zahrnující tyto dvě báze. Lze detekovat delecí u jedné z těchto bází.
8. Podobně jako u jakéhokoli pracovního postupu přípravy knihovny na bázi hybridizace mohou vlastní polymorfismy, mutace, inserce či delece ve vazebných oblastech oligonukleotidů ovlivnit alely, na něž sonda cílí, a také přiřazení uskutečněná v průběhu sekvenování. Příklad:
 - Varianta ve fázi s variantou v oblasti primeru nemusí být amplifikována, což má za následek falešně negativní výsledek.
 - Varianty v oblasti primeru by mohly zabránit amplifikaci referenční alely, což by vedlo k nesprávnému přiřazení homozygotní varianty.
 - Varianty indelů v oblasti primeru mohou způsobit falešně pozitivní přiřazení na konci čtení přilehlého k primeru.

9. Pokud se indely vyskytnou poblíž konce jednoho čtení a během zarovnání se jemně připnou, lze je kvůli vychýlení vláken filtrovat.
10. Malé MNV se nepotvrdí a jsou vykázány pouze v modulu pro analýzu somatických variant.
11. Delece se vykážou ve VCF na souřadnici předcházející báze v souladu s formátem VCF. Proto je nutné zvážit přílehlající varianty dříve, než se vykáže, že signál přiřazení individuální báze je homozygotní reference.
12. Specifická omezení týkající se germinálních variant:
 - Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Germline Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je určen k poskytování kvalitativních výsledků přiřazení germinálních variant (např. homozygotních, heterozygotních, divokého typu).
 - Při použití s modulem pro analýzu germinálních variant je pro přesné přiřazení variant potřeba minimální 150násobné pokrytí na amplikon. V důsledku toho je potřeba 150 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 300 překrývajícím se čtením párových konců. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
 - Zda bude varianta identifikována jako homozygotní nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
 - Varianty v určitém opakujícím se kontextu se vyfiltrují do souborů VCF. Filtr opakování RMxN se používá k filtrování variant, pokud se v referenčním genomu vedle pozice varianty opakovaně vyskytuje celá sekvence varianty nebo její část. V případě přiřazení varianty germinální linie vyžaduje filtrace varianty minimálně devět opakování v referenci. V úvahu se berou pouze opakování o délce do 5 bp (R5x9).
 - Indel a SNV na jednom lokusu mohou vyústit ve vykázání pouze jedné varianty.
13. Specifická omezení týkající se somatických variant.
 - Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Somatic Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky přiřazení somatických variant (např. přítomnost somatické varianty s četností varianty větší nebo rovnající se 0,026 s limitem detekce 0,05).
 - Při použití s modulem pro analýzu somatických variant je pro přesné přiřazení variant potřeba minimální pokrytí na amplikon 450x na oligonukleotidový fond. Na jeden fond oligonukleotidů je tedy zapotřebí 450 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 900 překrývajícím se čtením párových konců. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným obsahem genomu.
 - U přiřazení somatických variant je pro filtrování varianty potřeba alespoň šest opakování v referenci, přičemž se berou v úvahu pouze opakování o délce max. 3 bp (R3x6).
 - Modul pro analýzu somatických variant nedokáže rozlišit mezi germinálními a somatickými variantami. Modul je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
 - Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založena na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádorové a normální tkáně.

Složky produktu

Illumina NextSeq 550Dx obsahuje následující:

1. Přístroj NextSeq 550Dx (katalogové č. 20005715)
2. Softwarové komponenty pro Přístroj NextSeq 550Dx, včetně následujících:

Softwarová aplikace	Funkce	Popis
Obslužný software přístroje NextSeq 550Dx (NOS)	Řídí provoz přístroje	Softwarová aplikace NOS řídí provoz přístroje během sekvenování a vytváří snímky pro použití softwarem pro analýzu v reálném čase (Real-Time Analysis, RTA).
Software pro analýzu v reálném čase (Real-time Analysis, RTA)	Provádí primární analýzu	Softwarová aplikace RTA konvertuje snímky generované NOS pro každou dlaždici na cyklus běhu sekvenování do souborů přiřazení bází, které slouží jako vstupy pro analytické moduly softwaru Local Run Manager. Softwarová aplikace RTA neobsahuje uživatelské rozhraní.
Local Run Manager	Rozhraní pro výběr modulu	Software Local Run Manager je řešení pro správu uživatelů, pro výběr vhodného analytického modulu a pro informování o stavu monitorování. Toto řešení je integrované přímo do přístroje.
Modul pro analýzu somatických variant	Provádí sekundární analýzu	Tento analytický modul softwaru Local Run Manager zpracovává přiřazení bází prostřednictvím sekundární analýzy. Zpracování zahrnuje demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, přiřazení variant a vykazování. Program pro detekci variant (Pisces) generuje soubory VCF, které obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu, a zahrnuje naměřenou frekvenci variant.
Modul pro analýzu germinálních variant	Provádí sekundární analýzu	Tento analytický modul softwaru Local Run Manager zpracovává přiřazení bází prostřednictvím sekundární analýzy. Zpracování zahrnuje demultiplexing, generování souborů FASTQ, zarovnání, přiřazení variant a vykazování. Program pro detekci variant (Pisces) generuje soubory VCF, které obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu, a každou variantu identifikuje jako heterozygotní nebo homozygotní.

3. **Volitelné** Server Illumina DRAGEN pro NextSeq 550Dx (katalogové č. 20086130), včetně následujících softwarové komponenty:

Softwarová aplikace	Funkce	Popis
Illumina Run Manager	Rozhraní pro výběr aplikačního modulu	Software Illumina Run Manager je nainstalován na volitelném serveru DRAGEN mimo přístroj. Systém Illumina Run Manager umožňuje správu uživatelů, výběr analytického modulu a monitorování běhů sekvenování a stavu analýzy.

Volitelný server Illumina DRAGEN pro NextSeq 550Dx je k dostání pouze ve vybraných zemích. Informace o regionální dostupnosti vám poskytne zástupce společnosti Illumina.

Provozní podmínky

Další informace o provozních podmínkách naleznete v části Environmentální kritéria v *Průvodci přípravou místa pro používání přístroje NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009869)*.

Prvek	Specifikace
Teplota	Teplotu v laboratoři udržujte v rozmezí 19 až 25 °C (22 °C ±3 °C). Tato teplota je provozní teplotou přístroje. V průběhu sekvenačního běhu zabraňte změnám teploty prostředí o více než ±2 °C.
Vlhkost	Udržujte relativní vlhkost v rozmezí 20–80 % bez kondenzace.

Vybavení a materiály

Požadované vybavení a materiály prodávané samostatně

Sada reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů), katalogové č. 20028870

Sada reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů), katalogové č. 20028871

Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí dodávky

Uživatелеm dodávaný spotřební materiál pro sekvenování

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Čisticí ubrousky se 70% izopropylalkoholem nebo Etanol, 70 %	VWR, kat. č. 95041-714 (nebo ekvivalent) Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Čištění průtokové kyvety a obecné použití
Laboratorní utěrky, nepouštějící vlákna	VWR, kat. č. 21905-026 (nebo ekvivalent)	Čištění průtokové kyvety a obecné použití

Spotřební materiál dodaný uživatelem pro účely údržby přístroje

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
NaOCl, 5 % (chlornan sodný)	Sigma-Aldrich, katalogové č. 239305 (nebo ekvivalent laboratorní jakosti)	Ruční mytí přístroje po skončení běhu; mycí přípravek zředěný na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalogové č. P7949	Ruční mytí přístroje; mycí přípravek zředěný na 0,05 %
Voda, laboratorní jakost	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Mytí přístroje (ruční mytí)
Vzduchový filtr	Illumina, katalogové číslo 20063988	Čištění vzduchu nasávaného přístrojem pro účely chlazení

Pokyny ohledně vody laboratorní jakosti

Při provádění postupů na přístroji vždy používejte pouze vodu laboratorní jakosti nebo deionizovanou vodu. Nikdy nepoužívejte kohoutkovou vodu. Používejte pouze vodu následující nebo rovnocenné jakosti:

- Deionizovaná voda
- Illumina PW1
- Voda 18 megaohmů (MΩ)
- Voda Milli-Q
- Voda Super-Q
- Voda pro molekulární biologii

Varování a preventivní opatření



UPOZORNĚNÍ

Podle federálních zákonů se prodej tohoto zdravotnického prostředku omezuje na prodej lékařem nebo jiným držitelem povolení k používání tohoto zdravotnického prostředku či vystavení poukazu na tento prostředek v daném státě, kde provozuje svou činnost.

- Některé komponenty reagensů, které dodává Illumina pro použití s přístrojem Přístroj NextSeq 550Dx, obsahují potenciálně nebezpečné chemikálie. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k újmě na zdraví. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika expozice. S použitými reagensy nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a předpisy platnými ve vaší zemi.** Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.
- Neprodleně nahlase veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých uživatel a pacient sídlí.
- Se všemi vzorky krve zacházejte tak, jako by byly infikovány virem lidské imunodeficiency (HIV), lidským virem hepatitidy B (HBV) a dalšími krevními patogeny (univerzální opatření).
- Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagensů používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagensů si důkladně umyjte ruce.
- Dodržujte postupy správné laboratorní praxe a hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci reagensů, přístrojů a genomických vzorků DNA produkty PCR. Kontaminace PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.
- Aby se zabránilo kontaminaci, dbejte, aby se pro oblasti před amplifikací a po amplifikaci používalo vyhrazené vybavení a spotřební materiál (např. pipety, špičky pipet, tepelné bloky, vortexery a centrifugy).
- Párování indexů se vzorky se musí přesně shodovat s vytištěným rozvržením destičky. Software Local Run Manager automaticky vyplní indexační primery související s názvy vzorků, když se zadají do modulu. Doporučuje se, aby uživatel před spuštěním běhu sekvenování ověřil, že jsou indexační primery správně přiřazeny ke vzorkům. Rozdíly mezi vzorky a rozvržením destičky vyústí ve špatnou identifikaci pozitivních vzorků a vykazování nesprávných výsledků.
- Důrazně se doporučuje, aby si uživatel nainstaloval antivirový software, který bude počítač chránit proti virům. Pokyny k instalaci naleznete v uživatelské příručce.
- Přístroj NextSeq 550Dx nepoužívejte, pokud je z něj sejmut kterýkoli z krycích panelů. Používání přístroje, když jsou sejmuty některé z panelů, představuje riziko úrazu střídavým nebo stejnosměrným elektrickým proudem.
- Nedotýkejte se průtokové kyvety ve snímacím prostoru. Ohřívač v tomto prostoru může mít teplotu 22 °C až 95 °C a může způsobit popáleniny.

12. Přibližná hmotnost přístroje je 84 kg, takže v případě pádu nebo nevhodného zacházení může způsobit vážné poranění osob.

Návod k použití

Následující pokyny k použití Přístroj NextSeq 550Dx vyžadují reagentie dodané v sadě reagentií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) nebo NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů).

Vytvoření běhu

Vytvořte sekvenční běh pomocí Local Run Manager nebo Illumina Run Manager. Návod k použití Local Run Manager naleznete níže a v Referenční příručka k přístroji NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513). Pokyny k vytvoření cyklu pomocí Illumina Run Manager naleznete v Příručka k softwaru Illumina Run Manager pro NextSeq 550Dx (dokument č. 200025239).

Pokyny k výběru mezi Local Run Manager a Illumina Run Manager naleznete v Příručka k softwaru Illumina Run Manager pro NextSeq 550Dx (dokument č. 200025239). Podrobné pokyny ke konkrétním aplikacím naleznete v příručce k modulu nebo aplikaci pro konkrétní test.

Následující pokyny se týkají používání modulů Local Run Manager pro analýzu germinálních a somatických variant.

Nastavení parametrů

1. Přihlaste se do aplikace Local Run Manager.
2. Vyberte **Create Run** (Vytvořit běh) a vyberte **Somatic variant** (Somatická varianta) nebo **Germline Variant** (Germinální varianta).
3. Zadejte název běhu, který běh identifikuje od sekvenování až po analýzu. Používejte alfanumerické znaky, mezery, podtržítka nebo pomlčky.
4. [Volitelné] Pro lepší identifikaci běhu zadejte popis běhu. Používejte alfanumerické znaky, mezery, podtržítka nebo pomlčky.
5. V rozevíracím seznamu vyberte počet vzorků a sadu indexů. Při výběru zvažte následující informace.
 - Rozevírací seznam obsahuje čísla vzorků se sadou indexů. Například „24-sada 1“ označuje 24 vzorků, které se mají testovat s indexy ze sady indexů 1.
 - Čísla sad indexů se vztahují k různým sadám párů indexů i5 a i7. Sada 1 i sada 2 poskytují diverzitu indexů. Aby se zabránilo vyčerpání jedné sady, jsou k dispozici dvě sady indexů.
 - Vyberte počet vzorků, který se co nejvíce blíží počtu vzorků, který testujete. Pokud na seznamu není přesný počet vzorků, vyberte nejbližší číslo, které však bude nižší než počet, který testujete. Když například chcete testovat 18 vzorků, vyberte 16 vzorků.

- Navržené jamky pro vzorky a kombinace indexů, které splňují požadavky na diverzitu indexů, jsou zvýrazněny zeleně.

Importování souborů manifestů pro běh

1. Ujistěte se, že manifesty, které chcete importovat, jsou dostupné na přístupném umístění v síti nebo na USB disku.
2. Vyberte **Import Manifests** (Importovat manifesty).
3. Přejděte k souboru manifestu a vyberte manifesty, které chcete přidat.

POZNÁMKA Aby byly soubory manifestů dostupné pro všechny běhy za použití modulů pro analýzu germinálních nebo somatických variant, přidejte manifesty pomocí funkce Module Settings (Nastavení modulu). Tato funkce vyžaduje povolení na úrovni administrátora. Další informace najdete v části *Referenční příručka k přístroji NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Specifikace vzorků pro běh

Pomocí jedné z následujících možností s příslušnými pokyny specifikujte vzorky pro daný běh.


Enter samples manually (Ruční zadání vzorků) – Použijte prázdnou tabulku na obrazovce Create Run (Vytvořit běh).

Import samples (Importování vzorků) – Vyhledejte externí soubor ve formátu .csv (čárkou oddělené údaje). Na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) je k dispozici šablona ke stažení.


Ruční zadání vzorků

1. Zadejte unikátní název vzorku (*modul pro analýzu somatických variant*) nebo ID vzorku (*modul pro analýzu germinálních variant*).
Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
2. [Volitelné] V případě pozitivních nebo negativních kontrolních vzorků klepněte pravým tlačítkem myši a vyberte typ kontroly.
Kontrola jamky jednoho vzorku automaticky vyplní odpovídající jamku v druhém fondu stejnou kontrolou.
3. [Volitelné] Do pole Sample Description (Popis vzorku) zadejte popis vzorku.
Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
4. V rozevíracím seznamu Index 1 (i7) vyberte adaptér Indexu 1.
Pokud použijete navržené jamky vzorků, software automaticky vyplní indexové adaptéry i5 a i7, které splňují požadavky na diverzitu indexů. Pokud na seznamu není přesný počet vzorků, které testujete, vyberte indexové adaptéry pro extra jamky.
5. V rozevíracím seznamu Index 2 (i5) vyberte adaptér Indexu 2.
6. V rozevíracím seznamu manifestů vyberte soubor manifestů.

Vzorky ve fondu A vyžadují jiný manifest než vzorky ve fondu B.

7. Vyberte možnost pro zobrazení, tisk nebo uložení rozložení destičky jako reference pro přípravu knihoven:
 - Pro zobrazení rozvržení destičky vyberte ikonu  **Print** (Tisk). Pro tisk rozvržení destičky vyberte **Print** (Tisk).
 - Pro export informací o vzorcích do externího souboru vyberte **Export** (Exportovat).
8. Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Importování vzorků

1. Vyberte **Import Samples** (Importovat vzorky) a vyhledejte umístění souboru s informacemi o vzorcích. Můžete importovat dva typy souborů.
 - Pro nové rozvržení destičky vyberte na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) možnost **Template** (Šablona). Soubor se šablonou obsahuje správné nadpisy sloupců pro importování. K vzorkům v běhu zadejte do každého sloupce informace o vzorku. V nevyužitých buňkách vymažte informace uvedené jako příklad, a poté soubor uložte.
 - Pomocí funkce Export použijte soubor s informacemi o vzorku, který byl vyexportován z modulu pro analýzu germinálních nebo somatických variant.
2. Pro zobrazení rozvržení destičky vyberte ikonu  **Print** (Tisk).
3. Pro tisk rozvržení destičky jako reference pro přípravu knihoven vyberte **Print** (Tisk).
4. Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Příprava kazety reagensí

Chcete-li zdárně provést sekvenování, pozorně se řiďte pokyny pro nakládání s kazetou reagensí.

1. Ze skladovacích prostor s teplotou od -25 °C do -15 °C vyjměte kazetu reagensí.
2. Některou z následujících metod reagensie rozmrazte. Kazetu neponožujte. Po rozmrazení kazetu vysušte a teprve potom pokračujte dalším krokem.

Teplota	Doba rozmrazování	Limit stability
Vodní lázeň (15 °C až 30 °C)	60 minut	Nesmí přesáhnout 6 hodin
2 °C až 8 °C	7 hodin	Nesmí přesáhnout 5 dnů

POZNÁMKA Pokud se ve stejné vodní lázni rozmrazuje více než jedna kazeta, provádějte rozmrazování po delší dobu.

3. Pětkrát kazetu obraťte nahoru a dolů, aby se promíchaly reagensie.
4. Zkontrolujte dno kazety, zda se reagensie řádně rozmrazily a neobsahují žádné sraženiny. Zaměřte se zvláště na pozice 29, 30, 31 a 32, neboť jsou největší a jejich rozmrazení trvá nejdéle.
5. Opatrně kazetou poklepejte o pracovní stůl, abyste snížili počet vzduchových bublinek.

Nejllepších výsledků dosáhnete, přikročíte-li pak přímo k vložení vzorku a nastavení běhu.

Příprava průtokové kyvety

1. Ze skladových prostor s teplotou 2–8 °C vyjměte krabici s novou průtokovou kyvetou.
2. Sejměte balicí fólii a krabici 30 minut ponechte při pokojové teplotě.

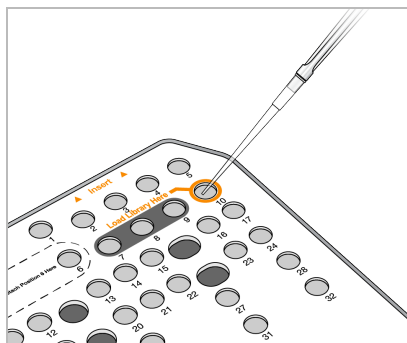
Příprava knihoven na sekvenování

Denaturujte a zřed'te knihovny na objem pro vložení 1,3 ml. V praxi může být koncentrace pro vložení různá podle přípravy knihovny a kvantifikačních metod. Ředění vzorků knihoven závisí na tom, nakolik komplexní jsou fondy oligonukleotidů. Pokyny k přípravě vzorků knihovny pro sekvenování včetně ředění a vkládání do fondu naleznete v návodu k použití sady pro přípravu příslušné knihovny. Na přístroji NextSeq 550Dx je třeba optimalizovat hustotu klastru.

Vložení knihoven do kazety reagentů

1. Utěrkou, která nepouští vlákna, očistěte těsnicí fólii zakrývající zásobník č. 10 označený jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu).
2. Těsnění propíchněte špičkou čisté 1ml pipety.
3. 1,3 ml připravených knihoven vložte do zásobníku č. 10 označeného jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu). Při vkládání knihoven se nedotýkejte těsnicí fólie.

Obrázek 1 Vložení knihoven



Nastavení sekvenačního běhu

Úplné pokyny k nastavení cyklu viz Referenční příručka k přístroji NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513).

1. K přístroji NextSeq 550Dx se přihlaste svým heslem k softwaru Local Run Manager nebo Illumina Run Manager.
2. Na obrazovce Home (Domů) softwaru NOS vyberte **Sequence** (Sekvence).
3. Na seznamu vyberte běh, a poté vyberte **Next** (Další).

Otevře se série obrazovek nastavení cyklu v následujícím pořadí: Vložení průtokové kyvety, vložení kazety s pufrem, vložení kazety s reagensy a kontrola před spuštěním běhu.

POZNÁMKA Běhy jsou přístupné pouze pomocí stejného Run Manageru, který byl použit při plánování běhu. Pokyny k nastavení softwaru Run Manager viz Příručka k softwaru Illumina Run Manager pro NextSeq 550Dx (dokument č. 200025239).

4. Když se objeví obrazovka Load Flow Cell (Vložení průtokové kyvety), vyčistěte a vložte průtokovou kyvetu.
 - Z obalové fólie vyjměte průtokovou kyvetu.
 - Otevřete průhledné obalové pouzdro z umělé hmoty a vyjměte průtokovou kyvetu.
 - Ubrouskem, který nepouští vlákna a je napuštěn alkoholem, očistěte skleněný povrch průtokové kyvety. Sklo osušte laboratorní utěrkou nepouštějící vlákna.
 - Zkontrolujte, že je skleněný povrch průtokové kyvety opravdu čistý. V případě potřeby čištění opakujte.
 - Odstraňte průtokovou kyvetu z předchozího běhu.
 - Zarovnejte průtokovou kyvetu podle zarovnávacích pinů a umístěte ji do snímacího prostoru.
5. Vyberte možnost **Load** (Vložit).

Dvířka se automaticky zavřou, na obrazovce se zobrazí ID průtokové kyvety a proběhne kontrola senzorů.
6. Postupujte podle pokynů softwaru a vyprázdněte nádobu od použitých reagensů, vložte kazetu s pufrem pro NextSeq 550Dx a vložte kazetu s reagensy pro NextSeq 550Dx.

Když je kazeta s pufrem i kazeta s reagensy pro NextSeq 550Dx vložena, software přečte a zaznamená RFID. Na obrazovce se objeví ID kazety s pufrem i kazety s reagensy a zkontrolují se senzory.
7. Až proběhne automatická kontrola před spuštěním běhu, zvolte možnost **Start** (Spustit). (Tento krok není třeba, pokud je nastaveno automatické spouštění).
8. Když se spustí běh, otevře se obrazovka Sequencing (Sekvenování). Tato obrazovka poskytuje vizuální reprezentaci probíhajícího běhu, a to včetně hodnot intenzity a kvalitativních skóre.

Výsledky

Software pro analýzu v reálném čase (Real-Time Analysis, RTA) je integrovaný software, který provádí analýzu snímků a přiřazení bází, a každé bázi za každý cyklus sekvenování přidělí kvalitativní skóre. Po dokončení primární analýzy vybraný aplikační modul automaticky zahájí sekundární analýzu. Zde popsané procesy sekundární analýzy jsou určeny pro moduly Local Run Manager pro analýzu germinálních a somatických variant Přístroj NextSeq 550Dx.

Demultiplexování

Demultiplexing porovnává každou sekvenci čtení indexu se sekvencemi indexu specifikovanými pro běh. V tomto kroku nejsou zvažovány žádné hodnoty kvality.

Čtení indexu jsou identifikována pomocí následujících kroků:

- Vzorky jsou číslovány od 1 podle pořadí, v jakém jsou uvedeny pro daný běh.
- Vzorek číslo 0 je vyhrazen pro klastry, které nebyly přiřazeny ke vzorku.
- Klastry jsou přiřazeny ke vzorku, když se indexová sekvence přesně shoduje nebo když existuje nejvýše jedna neshoda na jednotlivé čtení indexu.

Generování souborů FASTQ

Po demultiplexingu software generuje přechodné analytické soubory ve formátu FASTQ, což je textový formát používaný k reprezentaci sekvencí. Soubory FASTQ obsahují čtení pro každý vzorek a související skóre kvality. Klastry, které neprošly filtrem, jsou vyloučeny.

Každý soubor FASTQ obsahuje čtení pouze pro jeden vzorek a název tohoto vzorku je v názvu souboru FASTQ. V modulech pro analýzu germinálních a somatických variant se generuje osm souborů FASTQ na vzorek na jeden fond oligonukleotidů, čtyři ze čtení 1 a čtyři ze čtení 2. Tento výstup vyústí v celkem 8 souborů FASTQ na vzorek pro modul pro analýzu germinálních variant a 16 souborů FASTQ na vzorek pro modul pro analýzu somatických variant. Soubory FASTQ jsou primárním vstupem pro zarovnání.

Zarovnání

Během kroku zarovnání zarovnáva Smithův-Watermanův algoritmus klastry každého vzorku k sekvencím ampliconů uvedeným v souboru manifestů.

Smithův-Watermanův algoritmus provádí semiglobální zarovnávání sekvencí, aby určil podobné oblasti dvou sekvencí. Namísto porovnání celé sekvence porovnává Smithův-Watermanův algoritmus segmenty všech možných délek.

Každé čtení párových konců se vyhodnotí ve smyslu zarovnání k příslušným sondovacím sekvencím tohoto čtení.

- Při vyhodnocení čtení 1 je třeba zohlednit reverzní komplement níže položených lokusově specifických oligonukleotidů (DLSO).
- Při vyhodnocení čtení 2 je třeba zohlednit výše položené lokusově specifické oligonukleotidy (ULSO).
- Pokud se začátek čtení shoduje se sondovací sekvencí a není zde více než jeden rozdíl, celá délka čtení se zarovná s cílovým ampliconem této sekvence.
- Pokud se začátek čtení shoduje se sondovací sekvencí a nejsou zde více než tři rozdíly (rozdíly nebo posuny kvůli počátečním indelům), celá délka čtení se zarovná s cílovým ampliconem této sekvence.
- Indely v rámci DLSO a ULSO nebyly vzhledem k chemickým vlastnostem testu pozorovány.

Na základě frekvence rozdílů buď v oblasti zájmu, nebo v celém ampliconu – v závislosti na délce ampliconu – se z výsledků zarovnání vyfiltrují zarovnání. Vyfiltrovaná zarovnání se zapíší do souborů zarovnání jako nezarovnaná a při přiřazení variant se nepoužijí.

Přiřazení variant

Program pro detekci variant Pisces je určen k tomu, aby stanovil SNV a přiřazení indelových variant z knihoven připravených pro daný přístroj.

Výkazy a dodatečné výstupní soubory

Moduly pro analýzu variant vytvářejí zprávy ve formátu PDF a *.txt, které zobrazují metriky, jako je sekvenční hloubka a počty variant. Moduly také generují výstupní soubory, například VCF a gVCF pro aplikace přiřazující varianty.

Postupy kontroly kvality

Při vyhodnocování každého běhu, vzorku a přiřazení báze bere software NextSeq 550Dx v úvahu metriky kontroly kvality. Pozitivní a negativní kontroly se také doporučují při přípravě knihoven a je třeba je vyhodnotit. Kontroly se hodnotí následovně:

- **Negativní kontrola (kontrola bez šablony) nebo jiná negativní kontrola** – musí generovat očekávaný výsledek. Pokud negativní kontrola generuje výsledek odlišný od očekávaného výsledku, došlo možná k chybě při sledování vzorku, nesprávnému záznamu indexačních primerů nebo kontaminaci.
- **Vzorek s pozitivní kontrolou** – musí vygenerovat očekávaný výsledek. Pokud pozitivní kontrola generuje výsledek odlišný od očekávaného výsledku, mohla se vyskytnout chyba při sledování vzorků či zaznamenávání indexačních primerů.

Charakteristiky funkčnosti

Charakteristiky funkčnosti Přístroj NextSeq 550Dx byly stanoveny modulem pro analýzu germinálních a somatických variant pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a ověřeny pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Studie zahrnovaly indexování vzorků, přenos vzorků, vstup DNA, analytickou citlivost (mez blanku / mez detekce), přesnost, konzistenci výsledků, porovnání metod a reprodukovatelnost.

Analytické studie pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) byly určeny k hodnocení tvrzení o funkčnosti dříve stanovených pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Výsledky zjištěné pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx demonstrují, že sady reagensů (v2 a v2.5) mají srovnatelnou funkčnost. Charakteristiky funkčnosti související s pre-analytickými faktory, jako jsou například metody extrakce nebo interferující látky, viz *dokumentace přiložená k sadě TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Definice výpočtů používaných v charakteristikách funkčnosti

1. Procento pozitivní shody (PPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako varianty a které test správně vykáže.
 - $(\text{počet lokusů varianty správně vykázaných testem}) / (\text{celkový počet lokusů varianty})$
Lokusy varianty vykázané testem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně pozitivní (TP). Lokusy varianty vykázané testem jako referenční přiřazení nebo jiná přiřazení varianty jsou falešně negativní (FN).
2. Procento negativní shody (NPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako divoký typ a které test správně vykáže.
 - $(\text{počet lokusů divokého typu správně vykázaných testem}) / (\text{celkový počet lokusů divokého typu})$
Lokusy divokého typu vykázané testem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně negativní (TN). Lokusy divokého typu vykázané testem jako varianty jsou falešně pozitivní (FP).
3. Celková procentuální shoda (OPA) se počítá jako poměr lokusů správně vykázaných testem vzhledem k referenční metodě.
 - $((\text{počet lokusů varianty správně vykázaných testem}) + (\text{počet lokusů divokého typu správně vykázaných testem})) / ((\text{celkový počet lokusů varianty}) + (\text{celkový počet lokusů divokého typu}))$
4. Výpočty PPA, NPA a OPA nezahrnují případy bez přiřazení (varianta nebo referenční lokus nesplňují podmínky jednoho nebo více kvalitativních filtrů).
5. Frekvence autozomálního přiřazení se počítá jako celkový počet lokusů, jenž splňuje podmínky filtrů, děleno celkovým počtem pozic sekvenovaných pro chromozomy 1–22: chromozomy X a Y jsou vyloučeny. Tato metrika nezohledňuje shodu přiřazení s referenční metodou.

Funkčnost sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů)

Indexování vzorků

Indexační primery vzorků přidané během přípravy knihovny přiřazují každému vzorku DNA jedinečnou sekvenci. Tyto jedinečné sekvence umožňují sloučit více vzorků do jednoho sekvenačního běhu. Indexování vzorků se používá pro germinální i somatické pracovní postupy. Účelem této studie bylo stanovit minimální (8) a maximální (96) počet vzorků, které mohou být zpracovány pomocí Přístroj NextSeq 550Dx v jediném sekvenačním běhu. Testovalo se osm unikátních vzorků Platinum Genome s 12 různými kombinacemi indexačního primeru na vzorek. Výsledky čtyř běhů sekvenování získané modulem pro analýzu germinálních variant se porovnály s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0.

U první sady běhů se knihovny s 96 unikátně indexovanými vzorky testovaly reprezentativním testem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech, aby se ověřila schopnost testu konzistentně provádět genotypová přiřazení u daného vzorku s různými kombinacemi indexačního primeru. U druhé sady běhů se knihovny s osmi unikátně indexovanými vzorky sekvenovaly ve dvou běžích sekvenování, aby se ověřil minimální počet podporovaných indexů.

U běhů s 96 indexy se SNV pohybovala od 98,7 % do 100 %, PPA pro inserce a delece byla 100 % a NPA pro každou z 96 kombinací indexů byla 100 %. Běhy s 8 indexy měly hodnoty PPA 100 % (SNV, inserce a delece) a NPA 100 % pro každou z osmi kombinací indexů.

Přenos vzorků

Přístroj NextSeq 550Dx umožňuje sekvenování více vzorků a kontrol v jediném běhu sekvenování. Byla provedena studie k vyhodnocení rozsahu přenosu vzorků v rámci sekvenačního běhu a mezi sekvenačními běhy. Reprezentativním testem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 amplikonů) na 23 různých chromozomech, včetně obou pohlavních chromozomů, se testovaly dva vzorky Platinum Genome, jeden mužský a jeden ženský. Na přístroji NextSeq 550Dx se modulem pro analýzu germinálních variant sekvenovaly knihovny. Přenos mužských vzorků do ženských vzorků byl pozorován v důsledku přítomnosti čtení amplikonu z chromozomu Y v ženských vzorcích.

K přenosu v rámci běhu může docházet během generování klastrů, přiřazení bází indexového cyklu a demultiplexingu vzorků. Za účelem testování přenosu vzorků v rámci běhu sekvenování se fond knihovny sestávající ze 46 replikátů mužských i ženských vzorků a čtyř kontrol bez šablony jednou sekvenoval na přístroji NextSeq 550Dx. Přenos vzorků v rámci běhu se vyhodnotil porovnáním pokrytí každého ženského replikátu amplikony z chromozomu Y s průměrným pokrytím všech mužských replikátů ve fondu amplikony z chromozomu Y. Medián zjištěný u přenosu v rámci běhu činil 0,084 %.

Za účelem testování přenosu vzorků mezi běhy byly připraveny dva fondy knihoven, které se postupně sekvenovaly na přístroji NextSeq 550Dx. První fond obsahoval 46 replikátů ženského vzorku a dvě kontroly bez šablony. Druhý fond obsahoval 46 replikátů mužského vzorku a dvě kontroly bez šablony. Oba fondy používaly stejnou sadu indexových adaptérů. Nejprve byl sekvenován ženský fond, následoval sekvenční běh s mužským fondem a po něm následoval další opakovaný sekvenační běh s ženským fondem. Přenos vzorků mezi běhy se vyhodnotil porovnáním pokrytí odpovídajících replikátů opakovaného běhu ženského fondu a běhu mužského fondu amplikony z chromozomu Y. Medián zjištěný u přenosu mezi běhy činil 0,0076 %.

Vstup DNA

Krev (germinální)

Pro přípravu knihovny na přístroji Přístroj NextSeq 550Dx pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx s využitím pracovního postupu modulu pro analýzu germinálních variant byl stanoven rozsah vstupů DNA krve. Tento rozsah byl vyhodnocen provedením studie sériového ředění s použitím 13 vzorků Platinum Genome pomocí reprezentativního testu navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází napříč 23 různými chromozomy. Knihovna se sekvenovala dvěma přístroji NextSeq 550Dx pomocí jedné šarže sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Pět vzorků bylo testováno duplicitně při pěti úrovních vstupů DNA v rozmezí od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 12 ng). Osm vzorků se testovalo jako jediný replikát na každé z pěti úrovní vstupů DNA. Pro stanovení přesnosti byly genotypy vzorků porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0. Výsledky byly stanoveny pro každou úroveň vstupu. PPA pro každý typ varianty (SNV, inserce a delece) je uvedeno v [Tabulka 1](#); NPA je uvedeno v [Tabulka 2](#). Všechny úrovně vstupu měly podobnou přesnost. Doporučený vstup DNA pro sadu TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng, přičemž 25 ng a 100 ng představují spodní a horní hranici pro splnění charakteristik funkčnosti.

Tabulka 1 PPA výsledky pro každý vstup DNA podle typu varianty

Vstup DNA (ng)	Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA (%)
12	SNV	2 412	2 381	31	0	98,7
25			2 404	8	0	99,7
50			2 403	9	0	99,6
100			2 412	0	0	100
250			2 412	0	0	100
12	Inzerce	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	Delece	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

Tabulka 2 NPA pro každý vstup DNA

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)
12	430 940	4	26	> 99,9
25	430 936	0	34	100
50	430 936	2	32	> 99,9
100	430 942	0	28	100
250	430 942	0	28	100

FFPE (somatická)

Pro přípravu knihovny na přístroji NextSeq 550Dx pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx s využitím pracovního postupu modulu pro analýzu somatických variant byl stanoven rozsah vstupů DNA fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE). Rozsah vstupů DNA se vyhodnotil provedením sériového ředění tří vzorků Platinum Genome a reprezentativním testem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech. Buněčné linie GM12878 a GM12877 genomu Platinum Genome byly fixovány formalínem a zality do parafínu s následnou extrakcí DNA. GM12878 se zředila linií GM12877 tak, aby se alelické frekvence variant (VAF) 79 variant (55 SNV, 9 inzercí a 15 delecí) pohybovaly poblíž 0,025, 0,05 nebo 0,10. Každý vzorek měl dále 91 variant s vyššími frekvencemi variant až po VAF 1,0. Vzorky se zpracovaly duplicitně na pěti úrovních vstupu DNA s průměrným delta kvantitativním cyklem (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 a 7,8 měřeným sadou TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit. Každá knihovna se sekvenovala dvěma přístroji NextSeq 550Dx pomocí dvou sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Pro stanovení přesnosti byly přiřazené varianty vzorků porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0. PPA pro každý typ varianty (SNV, inzerce a delece) je uvedeno v [Tabulka 3](#); NPA je uvedeno v [Tabulka 4](#). Doporučený vstup DNA pro varianty s VAF 0,05 nebo vyšší je $dCq \leq 4$, přičemž pro splnění charakteristik funkčnosti představuje hodnota 4,6 spodní hranici.

Tabulka 3 PPA – výsledky pro každý vstup DNA podle typu varianty

Průměr dCq	Typ varianty	Očekávané varianty	Neočekávána žádná přiřazení	VAF cílového ředění					
				0,025		0,05		0,10	
				Varianty bez přiřazení	PPA (%)	Varianty bez přiřazení	PPA (%)	Varianty bez přiřazení	PPA (%)
2,1	SNV	808	—	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	Inzerce	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	Delece	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

Tabulka 4 NPA pro každý vstup DNA

Průměr dCq	Očekávaný divoký typ	VAF cílového ředění					
		0,025		0,05		0,10	
		Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)	Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)	Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)
2,1	93 688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1 308	100	1 336	100	784	100
6,0		3 900	> 99,9	3 296	> 99,9	2 996	100
7,8		3 020	> 99,9	2 880	> 99,9	2 448	> 99,9

Analytická citlivost (Mez blanku [LoB] a mez detekce [LoD])

Tato studie se provedla k vyhodnocení meze blanku (LoB) a meze detekce (LoD) modulu pro analýzu somatických variant na přístroji NextSeq 550Dx. To se provedlo reprezentativním testem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech. Buněčné linie GM12878 a GM12877 genomu Platinum Genome byly fixovány formalínem a zalaty do parafínu s následnou extrakcí DNA. GM12878 se zředila linií GM12877, aby frekvence 74 variant (53 SNV, 7 inzercí a 14 delecí) byla $0,05 \pm 0,02$. Linie GM12877 a zředěná linie GM12878 (GM12878-D) se testovaly šest po sobě jdoucích dní na jednom přístroji, přičemž se střídaly dvě šarže sad reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), a docílilo se tak celkem šesti běhů sekvenování. Tento test vyústil v 60 replikátů každé varianty GM12878-D a 72 replikátů každé odpovídající souřadnice divokého typu v GM12877 pro každou šarži reagentů. LoB a LoD se vypočítaly klasickou metodou pomocí neparametrické možnosti uvedené v CLSI EP17-A2. LoB a LoD se vypočítaly samostatně pro SNV, inzerci a delece, a to sloučením frekvencí variant daného typu varianty do fondu. Chyba I. typu byla definována jako 0,01 a chyba II. typu jako 0,05.

U LoB se frekvence variant sloučených do fondu seřadily od nejnižší po nejvyšší a pro každý typ varianty se vypočítala 99. pozice každé šarže reagentie (Tabulka 5). Modul pro analýzu somatických variant využívá ke stanovení kvalitativní detekce variant mezní hodnotu (účinnou LoB) VAF 0,026. Vypočítaná LoB ověřila, že tato mezní hodnota nemá za následek chybu I. typu větší než 0,01.

Tabulka 5 Mez blanku

Typ varianty	Celkový počet pozorování	LoB – šarže reagensů 1 (%)	LoB – šarže reagensů 2 (%)
SNV	3 816	0,77	0,77
Inzerce	504	0,56	0,56
Delece	1 008	1,20	1,20

U LoD se vypočítalo procento frekvencí jednotlivých mutací pro každou šarži reagensů a každý typ varianty pod mezní hodnotou 0,026 (Tabulka 6). Protože procenta byla nižší než 5% chyba II. typu (0,05), jako LoD se vypočítal medián kombinovaných frekvencí variant (Tabulka 6). Za LoD každého typu varianty se považovala větší ze dvou hodnot vypočítaných pro dvě šarže reagensů – 4,97 % pro SNV, 5,12 % pro inzerce a 5,26 % pro delece.

Tabulka 6 Mez detekce

Šarže reagensů	Typ varianty	Celkový počet pozorování	Počet měření VAF < 2,6 %	% měření VAF < 2,6 %	Mez detekce (%)
1	SNV	3 180	53	1,7	4,94
	Inzerce	420	6	1,4	5,08
	Delece	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3 180	51	1,6	4,97
	Inzerce	420	5	1,2	5,12
	Delece	840	7	0,80	5,26

Přesnost

Germinální

Následující studie byla provedena za účelem posouzení přesnosti přiřazení variant u modulu pro analýzu germinálních variant na Přístroj NextSeq 550Dx s použitím sady NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Reprezentativním testem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 amplikonů) na 23 různých chromozomech se testovalo 13 jedinečných vzorků Platinum Genome. Během pěti dnů provedli tři operátoři na třech sekvenačních přístrojích se třemi šaržemi reagensů celkem devět běhů. Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genomes verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzerce a delece. Není-li uvedeno jinak, byly spolehlivé genomové oblasti definovány na základě této referenční metody.

Tabulka 7 Shrnutí germinální shody

Kritéria	Celkový počet pozorování ¹	Výsledek pozorování ²	Výsledek podle běhu ³
----------	---------------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

PPA pro SNV	819	98,7	> 99,9
PPA pro inserce	819	95,0	98,9
PPA pro delece	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Počítáno jako počet vzorků na běh (91) × počet běhů (9) = 819.

²Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátu vzorku napříč všemi 9 běhy.

³Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

Tabulka 8 uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s Platinum Genome verze 2016-1.0. Kombinují se tři typy variant (SNV, inserce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a insercí/delece, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnávají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 8 Germinální shoda na vzorek

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Očekávané varianty ¹	TP	FN	Varianty bez přiřazení	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4 788	4 788	0	0	756 762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8 505	8 379	1	125	751 464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6 048	5 985	5	58	757 701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6 993	6 930	0	63	757 638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7 875	7 811	3	61	751 653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6 300	6 174	3	123	754 803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7 119	7 056	0	63	751 905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7 182	7 119	6	57	754 146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7 686	7 560	2	124	754 173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7 245	7 182	7	56	752 469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7 119	7 119	0	0	750 645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6 804	6 804	0	0	756 065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7 434	7 371	1	62	750 015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹ Celkový počet variant ve všech replikátech vzorků napříč 9 běhy.

Tabulka 9 uvádí data ze studie prezentované podle vzorků, přičemž se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 9 Germinální shoda na vzorek podle typu varianty

Vzorek	SNV			Inzerce			Delece		
	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN
NA12877	2 331	2 331	0	1 323	1 323	0	1 134	1 134	0
NA12878	5 733	5 733	0	1 260	1 197	1	1 512	1 449	0
NA12879	3 591	3 591	0	1 323	1 260	5	1 134	1 134	0
NA12880	4 221	4 221	0	1 512	1 512	0	1 260	1 197	0
NA12881	4 914	4 913	1	1 512	1 449	2	1 449	1 449	0
NA12882	3 717	3 717	0	1 386	1 323	3	1 197	1 134	0
NA12883	4 284	4 284	0	1 449	1 449	0	1 386	1 323	0
NA12884	4 284	4 284	0	1 575	1 512	6	1 323	1 323	0
NA12885	4 725	4 725	0	1 575	1 512	2	1 386	1 323	0
NA12886	4 347	4 347	0	1 449	1 386	7	1 449	1 449	0
NA12887	4 284	4 284	0	1 323	1 323	0	1 512	1 512	0
NA12888	4 158	4 158	0	1 449	1 449	0	1 197	1 197	0
NA12893	4 599	4 599	0	1 386	1 323	1	1 449	1 449	0

U vzorků se dále analyzovala přiřazení malých inzercí a delecí (indelů). Celkový souhrn je uveden v [Tabulka 10](#). Celkem se jednalo o 71 indelů o délce 1–24 bp v případě inzercí a o délce 1–25 bp v případě delecí.

Tabulka 10 Souhrn detekce germinálních indelů

Varianta Typ	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA
Inzerce	18 522	18 018	27	477	99,9
Delece	17 388	17 073	0	315	100

Reprezentativní test se skládal ze 150 ampliconů zahrnujících různý obsah genomu. Obsah GC u ampliconů se pohyboval v rozmezí 0,19–0,87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Aby se stanovil účinek obsahu genomu na procento správných přiřazení, byla data sestavena podle ampliconů (Tabulka 11). Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytnou nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %.

Tabulka 11 Germinální přesnost na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	76 167	0	0	100
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64 701	0	0	100
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	74 529	0	0	100
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	75 348	0	0	100
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	66 339	0	0	100
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57 330	0	0	100
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72 072	0	0	100
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	73 710	0	0	100
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	65 520	0	0	100
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	—	0,65	66 339	0	0	100
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	61 425	0	0	100
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	72 072	0	0	100
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71 253	0	0	100
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74 529	0	0	100
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	Indel	0,43	76 167	0	0	100
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59 787	0	0	100
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	74 823	0	1 344	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	—	0,43	67 977	0	0	100
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	57 330	0	0	100
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72 072	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	60 543	0	63	99,9
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	63 882	0	0	100
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79 443	0	0	100
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	—	0,29	63 882	0	0	100
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50 778	0	0	100
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	56 511	0	0	100
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50 778	0	0	100
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	—	0,78	61 425	0	0	100
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68 796	0	0	100
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	—	0,39	52 416	0	0	100
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67 977	0	0	100
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	54 873	0	0	100
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74 529	0	0	100
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	61 425	0	0	100
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	83 538	0	0	100
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	75 348	0	0	100
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76 608	0	378	99,5
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80 262	0	0	100
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	77 805	0	0	100
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	70 434	0	0	100
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76 986	0	0	100
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	74 529	0	0	100
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	—	0,44	59 787	0	0	100
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	72 072	0	0	100
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71 253	0	0	100
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	69 615	0	0	100
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73 710	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74 529	0	0	100
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	—	0,31	54 054	0	0	100
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	76 167	0	0	100
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	—	0,42	67 977	0	0	100
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72 171	0	720	99,0
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	54 873	0	0	100
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	80 262	0	0	100
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	53 235	0	0	100
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	—	0,49	78 624	0	0	100
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	67 977	0	0	100
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79 443	0	0	100
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63 882	0	0	100
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	74 529	0	0	100
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	64 701	0	0	100
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73 710	0	0	100
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	77 805	0	0	100
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	71 747	0	325	99,5
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	—	0,49	65 520	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	—	0,51	66 339	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	—	0,45	78 624	0	0	100
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	57 330	0	0	100
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	—	0,65	81 900	0	0	100
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	50 778	0	0	100
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	—	0,59	83 538	0	0	100
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	59 787	0	0	100
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	—	0,42	69 615	0	0	100
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	74 529	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	69 615	0	0	100
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69 615	0	0	100
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	69 615	0	0	100
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68 796	0	0	100
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76 167	0	0	100
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	—	0,49	66 339	0	0	100
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	58 149	0	0	100
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	77 805	0	0	100
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	—	0,52	59 787	0	0	100
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72 072	0	0	100
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	72 891	0	0	100
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	63 063	0	0	100
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54 873	0	0	100
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	—	0,25	67 977	0	0	100
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58 642	0	326	99,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	66 339	0	0	100
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	74 529	0	0	100
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	54 054	0	0	100
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	76 986	0	0	100
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	78 624	0	0	100
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	55 692	0	0	100
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76 167	0	0	100
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	77 805	0	0	100
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	58 149	0	0	100
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	—	0,36	74 529	0	0	100
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	57 330	0	0	100
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	—	0,27	51 597	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	77 805	0	0	100
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	71 253	0	0	100
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	85 176	0	0	100
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74 529	0	0	100
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	72 891	0	0	100
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71 247	0	6	100
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	74 529	0	0	100
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	76 167	0	0	100
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	72 891	0	0	100
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x 2)	0,29	66 343	27	788	98,8
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	74 529	0	0	100
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75 348	0	0	100
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	64 413	0	288	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	70 434	0	0	100
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	68 796	0	0	100
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	54 873	0	0	100
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	—	0,37	74 529	0	0	100
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56 511	0	0	100
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61 425	0	0	100
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66 339	0	0	100
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	69 615	0	0	100
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	—	0,48	53 235	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	—	0,59	81 081	0	0	100
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	—	0,68	60 605	1	0	100
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	—	0,64	57 330	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	—	0,61	76 986	0	0	100
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	67 158	0	0	100

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	62 244	0	0	100
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57 330	0	0	100
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	82 719	0	0	100
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	54 873	0	0	100
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	72 072	0	0	100
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	71 253	0	0	100
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	54 054	0	0	100
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80 262	0	0	100
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	71 253	0	0	100
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56 439	0	72	99,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73 710	0	0	100
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	81 900	0	0	100
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	—	0,68	79 443	0	0	100
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	79 443	0	0	100
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	—	0,6	81 081	0	0	100
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	75 348	0	0	100
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	56 511	0	0	100
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	56 511	0	0	100
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	—	0,52	58 149	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	—	0,55	0	0	0	—
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	—	0,48	0	0	0	—
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	—

Výsledky sekvenování vzorku NA12878 se porovnály s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 ampliconů bylo 92 ampliconů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 ampliconů mělo částečné překrytí a 17 ampliconů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Pro srovnání tento výsledek vyústil v 10 000 souřadnic na replikát. Nevariantní přiřazení báze se porovnála s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 12](#).

Tabulka 12 Germinální shoda vzorku NA12878 s databází NIST

Vzorek	Počet ampliconů	Průměrná míra přiřazení	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6 552	1	610 470	0	> 99,9	100	> 99,9

Na základě dat poskytnutých v této devítiběhové germinální studii lze tvrdit, že Přístroj NextSeq 550Dx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC $\geq 19\%$ (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech se správně přiřazeným 19% obsahem GC a mírou žádných přiřazení 0,6 %)
- Obsah GC $\leq 87\%$ (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech se správně přiřazeným 87% obsahem GC a nulovou frekvencí žádných přiřazení)
- Délky Poly A ≤ 9 (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování devíti nukleotidů Poly A a nulovou frekvencí žádných přiřazení)
- Délky Poly T ≤ 10 (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování deseti nukleotidů Poly T a nulovou frekvencí žádných přiřazení)
- Délky Poly G ≤ 7 (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování sedmi nukleotidů Poly G a míru žádných přiřazení 1,0 %)
- Délky Poly C ≤ 6 (všechny přiřazené báze v 2 457 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování šesti nukleotidů Poly C a nulovou frekvencí žádných přiřazení)
- Délky opakování dinukleotidů $\leq 11\times$ (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené 11 \times opakování dinukleotidů a míru žádných přiřazení 0,5 %)
- Délky opakování trinukleotidů $\leq 5\times$ (všechny přiřazené báze v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující 5 \times správně přiřazené opakování trinukleotidů a míru žádných přiřazení 0,5 %)
- Délky inzerce ≤ 24 (66 343 ze 66 370 přiřazených bází v 819 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazenou 24nukleotidovou inzerci s mírou žádných přiřazení 1,2 %. V oblasti, která obsahuje 24nukleotidovou inzerci, se nevyskytla žádná nesprávná přiřazení)
- Délky delece ≤ 25 (všechny přiřazené báze v 2 457 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazenou 25nukleotidovou delecii a nulovou frekvencí žádných přiřazení)

Somatická

Pro vyhodnocení přesnosti přiřazení variant modulu pro analýzu somatických variant na Přístroj NextSeq 550Dx pomocí sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) se použila zde popsaná studie.

Tato studie využila reprezentativní test určený k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází (150 amplikonů) na 23 různých chromozomech. Z bloků FFPE se izoloval Platinum Genome DNA, který generoval šest unikátních vzorků pro vyhodnocení studie.

Vzorek DNA GM12877 se zředil vzorkem DNA GM12878 DNA a vytvořil sadu unikátních heterozygotních variant s frekvencemi variant téměř 5 % a 7 % – GM12877-D5 a GM12877-D7. Podobně se vzorek DNA GM12878 zředil vzorkem DNA GM12877, čímž vznikly GM12878-D5 a GM12878-D7. Každý vzorek se testoval trojnásobně, řadě vzorky se testovaly v šesti opakováních. Během pěti dnů provedli tři operátoři na třech sekvenačních přístrojích se třemi šaržemi reagentů celkem devět běhů. Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genomes verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzercí a delecí. Není-li uvedeno jinak, byly spolehlivé genomové oblasti definovány na základě této referenční metody.

Tabulka 13 Souhrn somatických shod

Kritéria	Celkový počet pozorování ¹	Výsledek pozorování ²	Výsledek podle běhu ³
PPA pro SNV	378	98,9	99,9
PPA pro inzerce	378	96,9	99,9
PPA pro delece	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Počítáno jako počet vzorků na běh (42) × počet běhů (9) = 378.

²Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátu vzorku napříč všemi 9 běhy.

³Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

Tabulka 14 uvádí údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočet PPA se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Kombinují se tři typy variant (SNV, inzerce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a inzercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnávají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 14 Somatická shoda na vzorek

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Očekávaná hodnota	TP	FN	Varianty bez přiřazení	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2 052	2 025	0	27	318 682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3 645	3 564	0	81	317 645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2 592	2 538	0	54	323 614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3 078	3 024	0	54	322 038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3 294	3 213	0	81	322 121	0	100	100	100

Vzorek	Průměrná míra přiřazení	Očekávaná hodnota	TP	FN	Varianty bez přiřazení	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12888	99,8	2 916	2 889	0	27	323 048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9 288	8 930	0	358	630 621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9 288	9 032	0	256	629 719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9 288	8 699	42	547	628 582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9 288	9 108	0	180	629 803	0	100	100	100

Tabulka 15 uvádí data ze studie prezentované podle vzorků, přičemž se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 15 Somatická shoda na vzorek podle typu varianty

Vzorek	SNV			Inzerce			Delece		
	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2 457	2 457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1 539	1 539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1 836	1 836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2 025	2 025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1 782	1 782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5 454	5 392	0	1 782	1 647	0	2 052	1 891	0
GM12877-D7	5 454	5 406	0	1 782	1 728	0	2 052	1 898	0
GM12878-D5	5 454	5 192	28	1 782	1 651	9	2 052	1 856	5
GM12878-D7	5 454	5 445	0	1 782	1 719	0	2 052	1 944	0

U deseti vzorků se dále analyzovala přiřazení malých inzercí a delecí (indelů) (Tabulka 16). Celkem se jednalo o 71 indelů o délce 1–24 bp v případě inzercí a o délce 1–25 bp v případě delecí.

Tabulka 16 Souhrn somatické detekce indelů

Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA
Inzerce	10 773	10 282	9	482	99,2
Delece	11 502	10 667	5	830	> 99,9

K pokrytí různého genomického obsahu bylo určeno 150 ampliconů. Obsah GC ampliconů se pohyboval v rozmezí 0,19–0,87 %. V ampliconech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Aby se stanovil účinek obsahu genomu na procento správných přiřazení, byla data sestavena podle ampliconů (Tabulka 17). Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytnou nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %.

Tabulka 17 Somatická přesnost na úrovni ampliconu

Amplicon	Chromozom	Začátek ampliconu	Konec ampliconu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu ampliconu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
1	1	36 450 499	36 450 591	93	93	Indel	0,22	35 066	0	88	99,7
2	1	109 465 122	109 465 200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29 827	0	35	99,9
3	1	218 353 867	218 353 957	91	91	Indel	0,4	34 202	0	283	99,2
4	1	223 906 657	223 906 748	92	92	Indel	0,49	34 613	0	163	99,5
5	1	228 526 602	228 526 682	81	81	Poly G (5)	0,69	30 571	0	47	99,8
6	1	236 372 039	236 372 108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26 452	0	8	100,0
7	1	247 812 041	247 812 128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33 148	0	116	99,7
8	2	55 862 774	55 862 863	90	90	Indel	0,28	33 928	0	92	99,7
9	2	87 003 930	87 004 009	80	80	Indel	0,38	30 218	0	22	99,9
10	2	177 016 721	177 016 805	85	81	—	0,65	30 616	0	2	> 99,9
11	2	186 625 727	186 625 801	75	75	Poly A (8)	0,35	28 017	0	499	98,3
12	2	190 323 504	190 323 591	88	88	Poly T (5)	0,42	33 207	0	57	99,8
13	2	200 796 740	200 796 826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32 524	9	718	97,8
14	2	212 245 049	212 245 139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33 972	0	456	98,7
15	2	228 147 052	228 147 144	93	93	—	0,43	35 051	0	103	99,7
16	2	235 016 350	235 016 422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27 459	0	136	99,5
17	3	4 466 229	4 466 321	93	93	AT(3), indel	0,27	34 534	0	620	98,2
18	3	46 620 561	46 620 643	83	83	—	0,43	31 339	0	44	99,9
19	3	49 851 331	49 851 400	70	70	CT(3), indel	0,49	26 373	0	87	99,7

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
20	3	189 713 161	189 713 248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	32 829	0	857	97,5
21	3	190 106 030	190 106 104	75	74	Indel	0,57	27 925	0	47	99,8
22	4	2 233 667	2 233 744	78	78	Poly A (6)	0,26	29 327	4	162	99,4
23	4	7 780 541	7 780 637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36 585	0	117	99,7
24	4	15 688 604	15 688 681	78	78	—	0,29	29 427	0	57	99,8
25	4	56 236 521	56 236 586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23 356	5	75	99,7
26	4	102 839 244	102 839 314	71	69	Poly A (5)	0,46	25 942	0	140	99,5
27	4	164 446 743	164 446 804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22 944	0	560	97,6
28	5	1 882 081	1 882 158	78	75	—	0,78	28 299	0	53	99,8
29	5	14 769 061	14 769 144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31 658	0	94	99,7
30	5	41 069 808	41 069 871	64	64	—	0,39	24 120	0	72	99,7
31	5	74 077 114	74 077 196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31 297	0	77	99,8
32	5	147 475 343	147 475 409	67	67	Poly T (5)	0,37	25 277	0	55	99,8
33	5	149 323 731	149 323 821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34 308	0	90	99,7
34	5	155 662 213	155 662 287	75	75	Indel	0,43	28 266	0	163	99,4
35	6	6 318 713	6 318 814	102	102	Poly G (6)	0,68	38 489	0	67	99,8
36	6	24 949 983	24 950 074	92	92	Indel	0,63	34 730	0	46	99,9
37	6	31 084 900	31 084 999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35 057	0	483	98,6
38	6	32 147 987	32 148 084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36 647	0	406	98,9
39	6	32 986 864	32 986 958	95	95	Indel	0,53	35 681	0	238	99,3
40	6	33 408 498	33 408 583	86	86	Poly C (6)	0,7	32 438	0	70	99,8
41	6	41 647 401	41 647 495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35 441	0	91	99,7
42	6	112 435 865	112 435 955	91	91	Poly A (5)	0,44	34 354	0	44	99,9
43	7	22 202 076	22 202 148	73	73	—	0,44	27 575	0	28	99,9
44	7	66 276 100	66 276 187	88	88	Indel	0,35	33 060	0	213	99,4
45	7	77 365 735	77 365 821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32 423	0	489	98,5

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
46	7	110 939 946	110 940 030	85	85	Indel	0,38	32 074	0	56	99,8
47	7	128 533 468	128 533 557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33 791	0	281	99,2
48	7	149 503 875	149 503 965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34 316	0	82	99,8
49	7	154 404 519	154 404 599	81	66	—	0,31	24 901	0	47	99,8
50	7	156 476 507	156 476 599	93	93	Indel	0,35	35 067	0	87	99,8
51	8	1 817 312	1 817 394	83	83	—	0,42	31 365	0	9	> 99,9
52	8	24 811 020	24 811 109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32 781	0	890	97,4
53	8	76 518 625	76 518 691	67	67	Indel	0,3	25 228	0	146	99,4
54	9	103 054 909	103 055 006	98	98	Poly G (6)	0,67	36 968	0	76	99,8
55	9	105 586 150	105 586 214	65	65	Indel	0,32	24 472	0	100	99,6
56	9	107 620 823	107 620 918	96	96	—	0,49	36 203	0	85	99,8
57	9	123 769 149	123 769 231	83	83	AT(3)	0,37	31 329	0	45	99,9
58	9	138 995 345	138 995 441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36 472	0	201	99,5
59	10	5 987 120	5 987 198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29 473	0	11	> 99,9
60	10	11 784 629	11 784 726	98	91	GC(3)	0,87	34 188	0	213	99,4
61	10	27 317 777	27 317 855	79	79	Poly T (5)	0,3	29 843	0	19	99,9
62	10	33 018 351	33 018 440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33 968	0	68	99,8
63	10	45 084 159	45 084 253	95	95	Indel	0,35	35 829	0	81	99,8
64	10	55 892 599	55 892 687	89	88	AC(11), indel	0,42	32 098	88	2 048	93,8
65	10	101 611 250	101 611 329	80	80	—	0,49	30 217	0	28	99,9
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	—	0,51	30 531	0	96	99,7
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	—	0,45	36 105	0	192	99,5
68	11	30 177 648	30 177 717	70	70	Indel	0,46	26 318	0	153	99,4
69	11	47 470 345	47 470 444	100	100	—	0,65	37 785	0	24	99,9
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	23 368	0	68	99,7
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	—	0,59	38 546	0	10	> 99,9

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
72	11	93 529 612	93 529 684	73	73	Poly A (5)	0,4	27 516	0	78	99,7
73	11	101 347 052	101 347 136	85	85	—	0,42	32 083	0	48	99,9
74	11	102 477 336	102 477 426	91	91	Poly G (6)	0,55	34 047	0	369	98,9
75	11	118 406 285	118 406 369	85	85	Indel	0,53	32 065	0	74	99,8
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32 083	0	47	99,9
77	11	125 769 313	125 769 397	85	85	GA(3)	0,52	32 103	0	27	99,9
78	12	2 834 770	2 834 853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31 645	16	525	98,3
79	12	26 811 004	26 811 096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34 824	0	330	99,1
80	12	30 881 766	30 881 846	81	81	—	0,49	30 497	0	121	99,6
81	12	88 474 105	88 474 175	71	71	Poly A (6)	0,35	26 773	0	65	99,8
82	12	120 966 872	120 966 966	95	95	Poly G (5)	0,68	35 830	9	72	99,8
83	13	24 167 504	24 167 576	73	73	—	0,52	27 498	0	114	99,6
84	13	25 816 961	25 817 049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32 824	0	566	98,3
85	13	44 880 112	44 880 200	89	89	Indel	0,49	33 574	0	77	99,8
86	13	77 665 218	77 665 294	77	77	Indel	0,39	29 075	0	31	99,9
87	14	31 619 327	31 619 393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25 313	0	13	99,9
88	14	39 517 884	39 517 966	83	83	—	0,25	31 360	0	22	99,9
89	14	46 958 962	46 959 034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26 499	0	717	97,4
90	14	58 050 030	58 050 110	81	81	Indel	0,38	30 494	0	133	99,6
91	14	82 390 559	82 390 649	91	91	Indel	0,35	34 313	0	86	99,7
92	14	92 549 544	92 549 609	66	66	Poly A (5)	0,41	24 555	0	1 527	94,1
93	14	102 808 496	102 808 589	94	94	Indel	0,62	35 472	0	69	99,8
94	15	43 170 751	43 170 848	98	96	Poly C (5)	0,45	36 264	0	24	99,9
95	15	63 446 149	63 446 216	68	68	Indel	0,25	25 667	0	37	99,9
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34 745	0	432	98,8
97	15	81 625 334	81 625 428	95	95	Poly T (6)	0,43	35 870	0	40	99,9
98	15	85 438 263	85 438 334	72	71	Indel	0,65	26 762	0	76	99,7

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
99	15	89 817 413	89 817 503	91	91	—	0,36	34 286	0	112	99,7
100	15	89 864 274	89 864 343	70	70	Indel	0,56	26 449	0	11	> 99,9
101	16	1 894 910	1 894 972	63	63	—	0,27	23 809	0	5	> 99,9
102	16	28 997 904	28 997 998	95	95	Poly C (5)	0,67	35 860	0	50	99,9
103	16	53 682 908	53 682 994	87	87	TA(3)	0,41	32 835	0	60	99,8
104	16	57 954 406	57 954 509	104	104	Poly C (5)	0,67	39 177	0	144	99,6
105	16	85 706 375	85 706 465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34 075	0	323	99,1
106	17	3 563 920	3 564 008	89	89	GC(3)	0,64	33 632	0	11	> 99,9
107	17	3 594 191	3 594 277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32 752	0	134	99,6
108	17	3 970 090	3 970 180	91	91	Indel	0,46	34 343	0	82	99,8
109	17	16 084 945	16 085 037	93	93	Indel	0,26	35 077	0	78	99,8
110	17	33 998 759	33 998 849	91	89	Poly T (5)	0,54	33 553	0	89	99,7
111	17	39 589 691	39 589 774	84	82	Poly A (13), indel (x 2)	0,29	30 554	53	2 296	92,9
112	17	41 244 394	41 244 484	91	91	Poly A (5)	0,34	34 360	0	38	99,9
113	17	45 438 866	45 438 957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34 367	0	418	98,8
114	17	61 502 432	61 502 510	79	79	Indel	0,41	29 751	0	119	99,6
115	17	64 023 582	64 023 667	86	86	Poly T (7)	0,22	32 176	0	340	99,0
116	17	72 308 237	72 308 320	84	84	GAG(3)	0,62	31 604	7	141	99,5
117	18	2 616 456	2 616 522	67	67	GA(3)	0,31	25 273	8	45	99,8
118	18	6 980 478	6 980 568	91	91	—	0,37	34 386	0	12	> 99,9
119	18	9 888 026	9 888 094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25 692	0	399	98,5
120	18	38 836 999	38 837 073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27 923	0	893	96,9
121	18	47 405 382	47 405 462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30 598	0	20	99,9
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT(3), indel	0,45	31 969	0	161	99,5
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	—	0,48	24 531	0	48	99,8
124	19	625 143	625 241	99	99	—	0,59	37 298	0	124	99,7
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	—	0,68	27 881	0	109	99,6

Amplikon	Chromozom	Začátek amplikonu	Konec amplikonu	Velikost analyzovaného fragmentu	Báze v oblastech spolehlivosti	Obsah genomu amplikonu	Obsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	—	0,64	26 442	0	26	99,9
127	20	746 056	746 149	94	94	—	0,61	35 501	0	31	99,9
128	20	10 633 195	10 633 276	82	82	AC(3)	0,59	30 951	0	72	99,8
129	20	17 705 633	17 705 708	76	76	CT(3)	0,58	28 686	0	42	99,9
130	20	21 766 821	21 766 890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26 372	0	88	99,7
131	20	25 278 421	25 278 521	101	101	Indel	0,63	38 159	0	20	99,9
132	20	50 897 302	50 897 368	67	67	Indel	0,36	25 188	0	544	97,9
133	20	62 331 904	62 331 994	91	88	Poly G (6)	0,73	32 969	0	309	99,1
134	20	62 690 860	62 690 946	87	87	Indel	0,57	32 818	0	77	99,8
135	21	30 300 823	30 300 888	66	66	Indel	0,35	24 758	9	181	99,2
136	21	33 694 176	33 694 273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36 902	0	160	99,6
137	21	36 710 706	36 710 792	87	87	GT(3), indel	0,39	32 841	0	48	99,9
138	21	46 644 924	46 644 992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25 939	0	280	98,9
139	21	46 705 575	46 705 664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33 942	0	78	99,8
140	22	25 750 774	25 750 873	100	100	Indel	0,63	37 733	0	86	99,8
141	22	32 439 233	32 439 329	97	97	—	0,68	36 617	0	49	99,9
142	22	37 409 844	37 409 940	97	97	Indel	0,46	36 525	0	162	99,6
143	22	37 637 596	37 637 694	99	99	—	0,6	37 398	0	24	99,9
144	22	47 081 347	47 081 438	92	92	Indel	0,66	34 754	0	22	99,9
145	X	15 870 424	15 870 492	69	69	Poly T (5)	0,26	26 046	0	36	99,9
146	X	135 288 543	135 288 611	69	69	Poly C (5)	0,62	26 019	0	63	99,8
147	X	135 290 777	135 290 847	71	71	—	0,52	26 780	0	58	99,8
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	—	0,55	0	0	0	—
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	—	0,48	0	0	0	—
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	—

Výsledky sekvenování vzorku GM12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 150 ampliconů bylo 92 ampliconů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 41 ampliconů mělo částečné překrytí a 17 ampliconů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Pro srovnání tento výsledek vyústil v 10 000 souřadnic na replikát. Nevariantní přiřazení báze se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky jsou uvedeny v [Tabulka 18](#).

Tabulka 18 Somatická shoda vzorku GM12878 s databází NIST

Vzorek	Počet ampliconů	Průměrná míra přiřazení	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2 808	0	258 488	0	100	100	100

Na základě dat poskytnutých v této devítiběhové somatické studii lze tvrdit, že Přístroj NextSeq 550Dx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC $\geq 19\%$ (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech se správně přiřazeným 19% obsahem GC a mírou žádných přiřazení 2,6 %)
- Obsah GC $\leq 87\%$ (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech se správně přiřazeným 87% obsahem GC a mírou žádných přiřazení 0,6 %)
- Délky Poly A ≤ 9 (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování sedmi nukleotidů Poly A s mírou žádných přiřazení 2,5 %)
- Délky Poly T ≤ 10 (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování deseti nukleotidů Poly T a míru žádných přiřazení 0,1 %)
- Délky Poly G ≤ 6 (všechny přiřazené báze v 2 268 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování šesti nukleotidů Poly G a míru žádných přiřazení 0,5 %)
- Délky Poly C ≤ 6 (všechny přiřazené báze v 756 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené opakování šesti nukleotidů Poly C a míru žádných přiřazení 0,4 %)
- Délky opakování dinukleotidů $\leq 4\times$ (všechny přiřazené báze v 1 890 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené 4 \times opakování dinukleotidů a míru žádných přiřazení 0,9 %)
- Délky opakování trinukleotidů $\leq 5\times$ (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech obsahující 5 \times správně přiřazené opakování trinukleotidů a míru žádných přiřazení 1,4 %)
- Délky inzerce ≤ 23 (všechny přiřazené báze v 378 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazené inzerce 23 nukleotidů a míru žádných přiřazení 0,8 %)
- Délky delecce ≤ 25 (všechny přiřazené báze v 1 134 sekvenovaných ampliconech obsahující správně přiřazenou 25nukleotidovou delecí a míru žádných přiřazení 0,7 %)

Přesnost

Konzistence výsledků Přístroj NextSeq 550Dx byla stanovena testováním 13 vzorků Platinum Genome třemi přístroji, třemi šaržemi reagentů a třemi operátory, což v průběhu pěti dnů generovalo devět běhů sekvenování. Reprezentativní test, vzorky a referenční metoda se shodují s testem, vzorky a metodou popsány u studie

germinální přesnosti. Konzistence výsledků se stanovila analýzou rozptylu komponent pomocí VAF jako závisle proměnné a výpočtem směrodatných odchylek na úrovni komponenty pro přístroj, šarži reagensů, operátora a den zahájení (Tabulka 19). Celkový počet pozorování použitý při analýze každé komponenty variability přístroje, operátora a šarže reagensů byl 699 pro SNV, 176 pro inzerce a 235 pro delece.

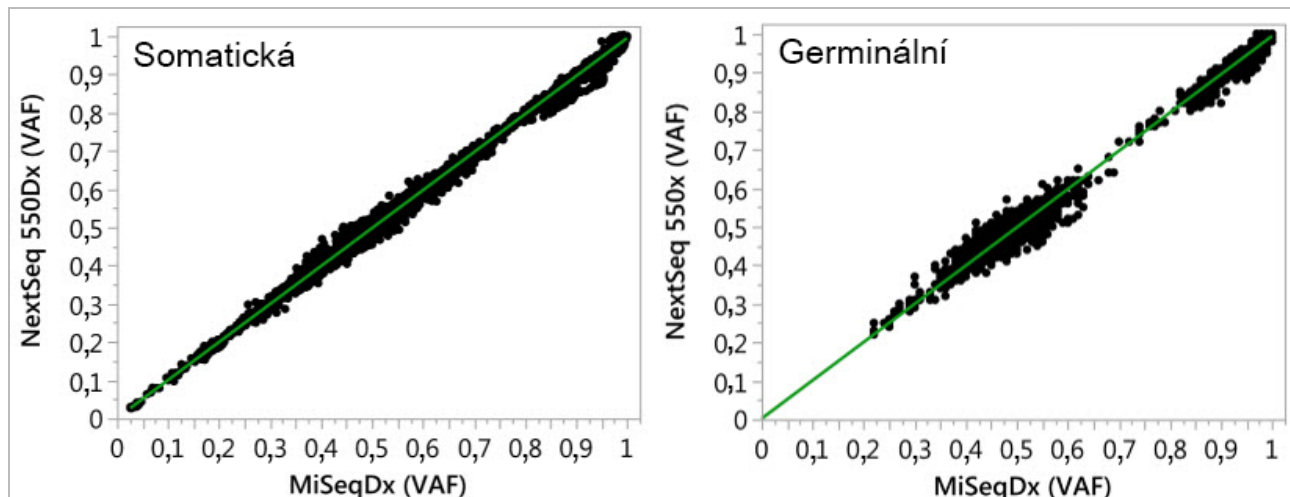
Tabulka 19 Výsledky stanovení konzistence přístroje NextSeq 550Dx (směrodatná odchylka, SD)

Komponenta	Typ varianty	SD komponenty		Celková SD	
		Max	Medián	Max	Medián
Šarže	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Inzerce	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delece	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Přístroj	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Inzerce	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delece	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operátor	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Inzerce	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delece	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Den	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Inzerce	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delece	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Porovnání metod (sekvenační platforma)

Na Přístroj NextSeq 550Dx a přístroji MiSeqDx se pomocí germinálních a somatických pracovních postupů sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx hodnotila plná krev a vzorky FFPE. Shoda frekvence variant krve a vzorků FFPE se vyhodnotila několika reprezentativními testy. Obrázek 2 znázorňuje korelaci VAF mezi dvěma přístroji v jednom reprezentativním testu a Tabulka 20 shrnuje tuto korelaci podle panelu testu. Na základě silné korelace mezi přístrojem MiSeqDx a Přístroj NextSeq 550Dx se zjistilo, že charakteristiky funkčnosti související s pre-analytickými faktory (např. metoda extrakce nebo interferující látky) jsou platné pro oba přístroje. Další podrobnosti viz dokumentace přiložená k sadě TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Obrázek 2 Korelace VAF vzorků FFPE (vlevo) a krve (vpravo) mezi přístroji MiSeqDx a NextSeq 550Dx zjištěná testem 1



Tabulka 20 Výsledky porovnání metod pomocí unikátních vzorků krve a FFPE

Zdroj gDNA	Test (Oligo panel)	Biologické replikáty (vzorky)	Technické replikáty (na vzorek)	Pozorování (počet variant)	Sklon	Průsečík	Korelace (R^2)
Krev	Test 1	45	2	8 369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Krev	Test 2	45	2	5 457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Test 1	46	2	8 319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Test 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Na základě uvedených omezení modulu pro analýzu germinálních variant byly odstraněny dva datové body.

²Koeficient determinace grafů VAF ilustrovaný na obrázku 2.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost výsledků Přístroj NextSeq 550Dx se hodnotila za použití vzorků Platinum Genome reprezentativním genomem určeným k vyhledání různých genů zahrnujících 12 588 bází na 23 různých chromozomech pomocí 150 ampliconů. Germinální testování zahrnovalo sedm replikátů 13 vzorků, somatické testování zahrnovalo šest replikátů sedmi vzorků s různými úrovněmi VAF. Vzorky byly připraveny pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testování se provádělo ve třech externích laboratořích pomocí jedné šarže sady reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). V každé laboratoři se použil jeden přístroj NextSeq 550Dx. Testování na každém pracovišti prováděli dva operátoři. Každý operátor prováděl testování každého typu vzorku po dobu tří po sobě jdoucích dní, celkem se ve třech laboratořích provedlo 36 běhů. Toto testování vyústilo v 18 běhů pro germinální i somatický pracovní postup.

Germinální

Germinální varianty s úrovní VAF $\geq 0,2$ se vykazují jako pozitivní (varianta). U očekávaných pozitivních germinálních variant se u všech typů variant (SNV, inzercí a delecí) hodnotily údaje pro frekvenci žádného přiřazení a míru správného pozitivního přiřazení. [Tabulka 21](#) shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 21 Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty

Typ varianty	Žádné přiřazení			Správné pozitivní přiřazení			95% LCL	95% UCL
	Pozorováno	Celkem	Procento	Pozorováno	Celkem	Procento		
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Inzerce	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Delece	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Germinální varianty s úrovní VAF $< 0,2$ se vykazují jako negativní (divoký typ). U očekávaných negativních germinálních umístění se hodnotily údaje zahrnující míru žádného přiřazení a míru správného přiřazení divokého typu. [Tabulka 22](#) shrnuje pozorované frekvence spolu se spodním a horním 95% intervalem spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítaným metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 22 Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných negativních výsledků

Typ varianty	Žádné přiřazení			Správné negativní přiřazení			95% LCL	95% UCL
	Pozorováno	Celkem	Procento	Pozorováno	Celkem	Procento		
Divoký typ	4 883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Germinální varianty s úrovní VAF $\geq 0,2$ a $< 0,7$ se nazývají pozitivní heterozygotní pro variantu a varianty s úrovní VAF $\geq 0,7$ jsou shledány pozitivně homozygotními pro danou variantu. Ke stanovení, zda inherentní variabilita testu ovlivní přiřazení genotypu, se použily germinální vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota Cx, přičemž x je podíl opakovaných testů, které překračují mezní hodnotu. U spodní mezní hodnoty VAF 0,2 činila hodnota Cx $\geq 99,999\%$, což znamená, že $\geq 99,999\%$ heterozygotních variant bude shledáno heterozygotními. S ohledem na horní mezní hodnotu VAF 0,7 činila hodnota Cx $\leq 0,001\%$, což znamená, že $\leq 0,001\%$ heterozygotních variant bude shledáno homozygotními. [Tabulka 23](#) shrnuje výsledky dle typu varianty.

Germinální varianty s úrovní VAF $\geq 0,2$ a $< 0,7$ se nazývají pozitivní heterozygotní pro variantu a varianty s úrovní VAF $\geq 0,7$ jsou shledány pozitivně homozygotními pro danou variantu. Ke stanovení, zda inherentní variabilita testu ovlivní přiřazení genotypu, se použily germinální vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota Cx, přičemž x je podíl opakovaných testů, které překračují mezní hodnotu. S ohledem na spodní mezní hodnotu VAF 0,2 činila hodnota Cx $\geq 99,999\%$, což znamená, že $\geq 99,999\%$ heterozygotních variant bude shledáno heterozygotními. U horní mezní hodnoty VAF 0,7 činila hodnota Cx $\leq 0,001\%$, což znamená, že $\leq 0,001\%$ heterozygotních variant bude shledáno heterozygotními. [Tabulka 23](#) shrnuje výsledky dle typu varianty.

Tabulka 23 Germinální hodnoty Cx pro heterozygotní varianty

Typ varianty	Mezní hodnota VAF 0,2	Mezní hodnota VAF 0,7
	≥ C99,999 %	≤ C0,001 %
SNV	94/94	94/94
Inzerce	24/24	24/24
Delece	35/35	35/35
Celkem	153	153

Somatická

Somatické varianty s úrovní VAF $\geq 0,026$ se vykazují jako pozitivní (varianty). Pozorování s úrovní VAF $\geq 0,01$ a $< 0,026$ se pro účely této analýzy považovala za nejednoznačná (ani pozitivní ani negativní, označená jako pozorování s nízkou frekvencí variant). Pro posouzení funkčnosti se výsledky vypočítávaly třemi způsoby:

- Nejlepší případ: Jakýkoli nejednoznačný výsledek byl považován za správné pozitivní přiřazení (shodu s očekávaným výsledkem)
- Nejhorší případ: Jakýkoli nejednoznačný výsledek byl považován za nesprávné přiřazení (neshodu s očekávaným výsledkem)
- Příklad vyloučení: Jakýkoli nejednoznačný výsledek byl z analýzy vyloučen

Tři tabulky, [Tabulka 24](#), [Tabulka 25](#) a [Tabulka 26](#), shrnují výsledky přiřazení u nejlepšího případu, nejhoršího případu a případu vyloučení, a to spolu se spodní a horní 95% úrovní spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítanou metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 24 Pozorování somatických přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty (nejlepší případ)

Typ varianty	Správné pozitivní přiřazení				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabulka 25 Pozorování somatických přiřazení pro očekávané pozitivní výsledky podle typu varianty (nejhorší případ)

Typ varianty	Správné pozitivní přiřazení				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabulka 26 Pozorování somatických přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty (odstraněná nejednoznačná přiřazení)

Typ varianty	Správné pozitivní přiřazení				
	Pozorováno	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Inzerce	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Delece	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatické varianty s úrovní VAF < 0,01 se vykazují jako negativní (divoký typ) přiřazení. U očekávaných negativních somatických umístění se hodnotily údaje zahrnující míru žádného přiřazení a míru správného přiřazení divokého typu. Správná přiřazení divokého typu se stanovila vyloučením žádných přiřazení, odečtením pozorovaných přiřazení, která spadala do nejednoznačné zóny (úroveň VAF $\geq 0,01$ a < 0,026), a nesprávných přiřazení, která se nacházela nad mezní hodnotou (úroveň VAF $\geq 0,026$). [Tabulka 27](#) shrnuje pozorované, celkové a procentuální výsledky negativních somatických umístění pro míru žádného přiřazení a míru správného přiřazení divokého typu spolu se spodní a horní 95% úrovní spolehlivosti (LCL, UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 27 Pozorování somatických přiřazení u očekávaných negativních výsledků

Varianta Typ	Žádné přiřazení			Správné přiřazení						
	Pozorováno	Celkem	Procento	Nejednoznačné	Nesprávné	Správné	Celkem	Procento	95% LCL	95% UCL
Divoký typ	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Pro zjištění C95 testu (v rámci každého typu varianty) se vyhodnotily somatické vzorky s různými úrovněmi VAF u stejné varianty. K vyhodnocení variability poblíž mezní hodnoty testu se použily vzorky s očekávanými úrovněmi VAF mezi 0,02 a 0,07. Pro každou variantu se stanovila hodnota C95, nejvyšší hodnoty C95 pro každou variantu jsou uvedeny v [Tabulka 28](#).

Tabulka 28 Souhrn somatických hodnot C95

Typ varianty	N	C95
SNV	74	0,0613
Inzerce	24	0,0573
Delece	33	0,0575

Funkčnost sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů)

Přehled

Přístroj NextSeq 550Dx je podporován dvěma sadami reagensií: sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Aby se demonstrovalo, že sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) dokáže splnit požadavky na analytickou funkčnost ověřenou a prokázanou u sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), byly provedeny studie se sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx byly připraveny dvě knihovny, jedna s využitím germinálního pracovního postupu a druhá s využitím somatického pracovního postupu. Knihovny vytvořené každým pracovním postupem se testovaly třemi přístroji NextSeq 550Dx a třemi šaržemi sad reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Testování každého pracovního postupu dále zahrnovalo jeden běh se sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Analytická citlivost (Mez blanku [LoB] a mez detekce [LoD])

Ověření se sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) ukázalo, že Přístroj NextSeq 550Dx dokáže detekovat varianty s VAF 0,05 s chybou II. typu $\leq 0,05$ a mezní hodnota VAF 0,026 používaná modulem pro analýzu somatických variant (účinná LoB) podporuje chybu I. typu $\leq 0,01$. Na základě těchto tvrzení se očekává, že varianta s 0,05 VAF je v 95 % případů častější než s VAF 0,026 a pozice divokého typu má v 99 % případů VAF nižší než 0,026. Aby se potvrdilo, že sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) tyto nároky splňuje, provedla se na přístroji NextSeq 550Dx se sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) opakovaná měření s divokým typem vzorků (vzorky LoB) a se vzorky obsahujícími varianty s VAF 0,05 (vzorky LoD). Podíl přiřazení nad a pod mezní hodnotou 0,026 se poté porovnal s tvrzeními stanovenými sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Testování zahrnovalo dva vzorky LoD, každý s unikátní sadou variant cílenou na VAF 0,05, a odpovídající vzorky LoB, které byly pro cílené varianty divokým typem. Pro přípravu knihoven bylo pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx zpracováno sedm replikátů vzorků LoB a osm replikátů vzorků LoD. Knihovny se nejprve sekvenovaly pomocí sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů), aby se identifikovaly varianty / genomické souřadnice pro vyhodnocení LoB/LoD pomocí sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů). Na základě výsledků sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) se všechny varianty s průměrnou VAF mezi 0,045–0,055 (varianty LoD) použily pro analýzu LoD (N = 51 variant). U analýzy LoB bylo hodnoceno 51 odpovídajících genomických souřadnic.

Pro vyhodnocení sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se knihovny sekvenovaly ve třech běžích tři po sobě jdoucích dny na stejném přístroji a pomocí stejné šarže sady reagensií.

Testování obnášelo 24 replikátů každé z 51 LoD variant a 21 replikátů každé odpovídající pozice divokého typu. Podíl přiřazení divokého typu s VAF < 0,026 je uveden v [Tabulka 29](#). Podíl přiřazení variant LoD s VAF ≥ 0,026 je uveden v [Tabulka 30](#).

Tabulka 29 Podíl přiřazení < 0,026 pro pozice divokého typu (vyhodnocení tvrzení LoB)

Varianta Typ	Hodnocené pozice	Celkový počet pozorování	Počet VAF měření ≥ 2,6 %	Podíl < 2,6 %	Podíl 95 % Interval spolehlivosti
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Inzerce	11	231	0	1	0,984–1
Delece	8	168	0	1	0,978–1

Tabulka 30 Podíl přiřazení s VAF ≥ 0,026 u variant LoD (Hodnocení LoD)

Varianta Typ	Hodnocené pozice	Celkový počet pozorování	Počet VAF měření < 2,6 %	Počet VAF měření ≥ 2,6 %	Podíl ≥ 2,6 %	Podíl 95 % Interval spolehlivosti
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Inzerce	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Delece	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Přesnost

Germinální

Následující studie byla provedena, aby pomocí sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotila přesnost přiřazení variant modulu pro analýzu germinálních variant. Pomocí reprezentativního testu se testovalo dvanáct jedinečných vzorků Platinum Genome. Za použití tří přístrojů NextSeq 550Dx a tří sad reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se celkem provedlo 11 běhů.

Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genomes verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, inzercí a delecí. Pro referenci jsou uvedeny výsledky z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Souhrn výsledků je uveden v [Tabulka 31](#).

Tabulka 31 Shrnutí germinální shody

Kritéria	Celkový počet pozorování (v2.5) ¹	Výsledek pozorování (v2.5) ²	Výsledek pozorování (v2) ³	Výsledek běhu (v2.5) ⁴	Výsledek běhu (v2) ⁴
PPA pro SNV	1 056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9

Kritéria	Celkový počet pozorování (v2.5) ¹	Výsledek pozorování (v2.5) ²	Výsledek pozorování (v2) ³	Výsledek běhu (v2.5) ⁴	Výsledek běhu (v2) ⁴
PPA pro inserce	1 056	100	100	100	100
PPA pro delece	1 056	95,2	95,2	> 99,9	> 99,9
NPA	1 056	100	100	100	100
OPA	1 056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Počítáno jako počet vzorků na běh x počet běhů (96 vzorků na běh x 11 běhů = 1 056 pozorování).

²Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků ve všech bězích (na základě 11 běhů se sadou reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci 1 běhu (celkem 96 pozorování).

⁴ Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

Somatická

Pro vyhodnocení přesnosti přiřazení variant modulu pro analýzu somatických variant na přístroji NextSeq 550Dx byla pomocí sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) provedena následující studie. Reprezentativním testem se testovalo deset vzorků FFPE Platinum Genome (dva s variantami zředitými na VAF 0,05). Za použití tří přístrojů NextSeq 550Dx a tří šarží sad reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se celkem provedlo 11 běhů.

Porovnáním výsledků s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou, Platinum Genomes verze 2016-1.0, se stanovila přesnost SNV, insercí a delecí. Pro referenci jsou uvedeny výsledky z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). Souhrn výsledků je uveden v [Tabulka 32](#).

Tabulka 32 Souhrn somatických shod

Kritéria	Celkový počet pozorování (v2.5) ¹	Výsledek pozorování (v2.5) ²	Výsledek pozorování (v2) ³	Výsledek podle běhu (v2.5) ⁴	Výsledek podle běhu (v2) ⁴
PPA pro SNV	528	100	100	100	100
PPA pro inserce	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA pro delece	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

¹Počítáno jako počet vzorků na běh x počet běhů (48 vzorků na běh x 11 běhů = 528 pozorování).

²Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků ve všech bězích (na základě 11 běhů se sadou reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátů vzorků v rámci 1 běhu (celkem 96 pozorování).

⁴Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

Přesnost

Germinální

Pomocí vzorků Platinum Genome a reprezentativního testu byla vyhodnocena konzistence výsledků sady reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) s modulem pro analýzu germinálních variant. Testování zahrnovalo přípravu jedné knihovny pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a 12 vzorků, přičemž se každý zpracoval s osmi replikáty. Za použití tří šarží sad reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) a tří přístrojů NextSeq 550Dx se provedlo celkem devět běhů sekvenování knihoven.

Ke stanovení, zda inherentní variabilita testu ovlivní přiřazení genotypu (N = 153 jedinečných heterozygotních variant), se použily vzorky s heterozygotními variantami. Pro obě mezní hodnoty modulu pro analýzu germinálních variant (0,2 pro heterozygotní a 0,7 pro homozygotní genotypy) se stanovila hodnota Cx, přičemž x je podíl opakovaných testů, které překračují mezní hodnotu. U spodní mezní hodnoty VAF 0,2 byla varianta s minimální hodnotou Cx pro sadu reagensíí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) > 99,9 %, což znamená, že > 99,9 % heterozygotních variant bude považováno za heterozygotní. U horní mezní hodnoty VAF 0,7 byla varianta s maximální hodnotou Cx pro sadu reagensíí NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) < 1,5 %, což znamená, že ≤ 1,5 % heterozygotních variant bude považováno za homozygotní. [Tabulka 33](#) shrnuje výsledky dle typu varianty. Pro referenci jsou uvedeny hodnoty Cx z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Tabulka 33 Germinální hodnoty Cx pro heterozygotní varianty

Typ varianty	N	Mezní hodnota VAF 0,2		Mezní hodnota VAF 0,7	
		Min Cx (v2.5) ¹	Min Cx (v2) ²	Max Cx (v2.5) ¹	Max Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5 %	1,0 %
Inzerce	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Delece	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Hodnoty Cx na základě odhadů celkové směrodatné odchylky z analýzy rozptylu komponent.

²Hodnoty Cx na základě směrodatné odchylky vzorků.

Somatická

Pomocí FFPE vzorků Platinum Genome a reprezentativního testu byla vyhodnocena konzistence výsledků sady reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) s modulem pro analýzu somatických variant. Testování zahrnovalo přípravu jedné knihovny pomocí sady TruSeq Custom Amplicon Kit Dx a dva

vzorky, přičemž se každý zpracoval s osmi replikáty. S použitím tří sad reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) a tří přístrojů NextSeq 550Dx se provedlo celkem devět běhů sekvenování knihoven.

K vyhodnocení variability přístroje poblíž mezní hodnoty VAF modulu pro analýzu somatických variant (somatické varianty s úrovněmi VAF $\geq 0,026$ jsou pro variantu pozitivní) se použily somatické varianty s očekávanými úrovněmi VAF $\leq 0,10$ (N = 131 jedinečných variant). Pro každou somatickou variantu se stanovily hodnoty C95. Hodnoty C95 představují VAF, která má 95% pravděpodobnost, že bude větší než mezní hodnota VAF modulu pro analýzu somatických variant. Nejvyšší hodnoty C95 podle typu varianty jsou uvedeny v [Tabulka 34](#). Pro referenci jsou uvedeny výsledky C95 z jednoho běhu sekvenování pomocí sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů).

Tabulka 34 Souhrn somatických hodnot C95

Typ varianty	Počet hodnocených variant	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Inzerce	24	0,062	0,061
Delece	33	0,060	0,060

¹Hodnoty C95 na základě odhadů celkové směrodatné odchylky z analýzy rozptylu komponent.

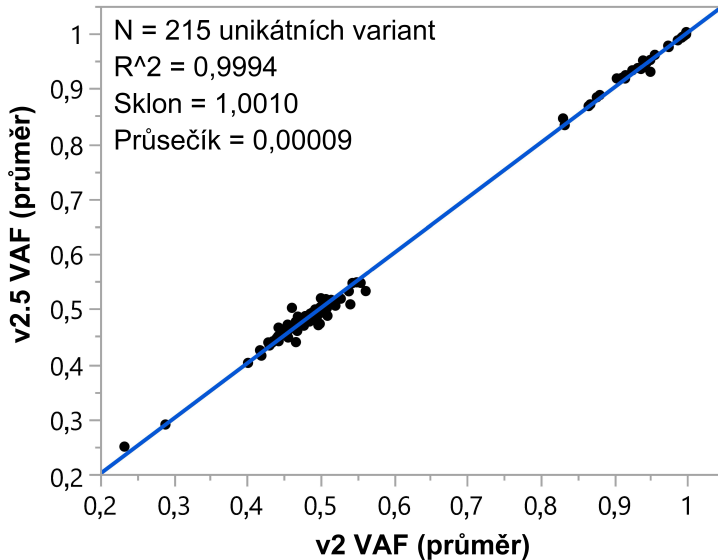
²Hodnoty C95 na základě směrodatné odchylky vzorků.

Porovnání metod (sada reagensií)

Germinální

Na základě výsledků generovaných modulem pro analýzu germinálních variant se pomocí sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sady reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotily průměrné VAF u 215 unikátních variant. Průměry VAF se vypočítaly z 11 běhů sekvenování (v2.5) a jednoho běhu sekvenování (v2). K výpočtu průměru každé varianty se použilo alespoň osm replikátů. [Obrázek 3](#) znázorňuje korelaci VAF mezi těmito dvěma sadami reagensií. Na základě silné lineární korelace VAF a podobnosti výsledků sad reagensií bylo stanoveno, že charakteristiky funkčnosti původně ověřené a potvrzené sadou reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a modulem pro analýzu germinálních variant jsou použitelné pro sadu reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).

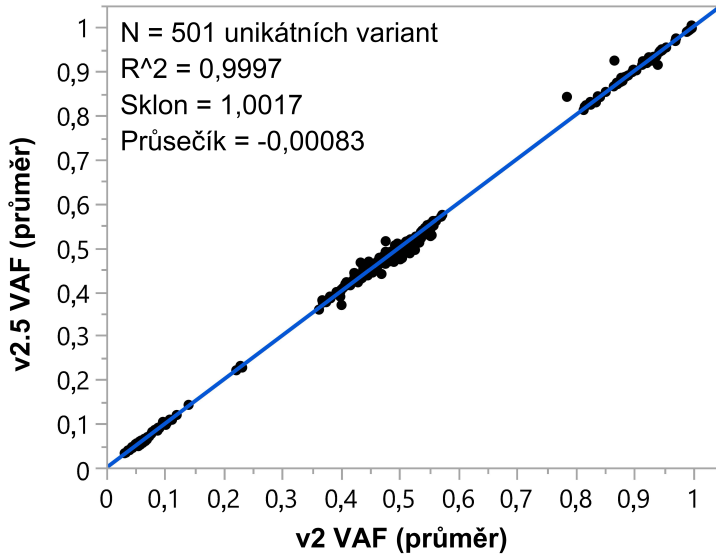
Obrázek 3 Korelace alelické frekvence variant (VAF) modulu germinálních variant mezi sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).



Somatická

Na základě výsledků generovaných modulem pro analýzu somatických variant se pomocí sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) vyhodnotily průměrné VAF u 501 unikátní varianty. Průměry VAF se vypočítaly z 11 běhů sekvenování (v2.5) a jednoho běhu sekvenování (v2). K výpočtu průměru každé unikátní varianty se použily alespoň tři replikáty. [Obrázek 4](#) znázorňuje korelaci VAF mezi těmito dvěma sadami reagensů. Na základě korelace VAF a podobnosti výsledků sad reagensů bylo stanoveno, že charakteristiky funkčnosti ověřené a potvrzené sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a modulem pro analýzu somatických variant jsou použitelné pro sadu reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).

Obrázek 4 Korelace alelické frekvence variant (VAF) modulu somatických variant mezi sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů) a sadou reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů).



Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 200031448 v00	Červen 2023	<p>První vydání. Předchozí dokument 1000000030326 byl nahrazen tímto dokumentem.</p> <p>Změny z dokumentu 1000000030326 v6 na tento nový dokument:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Byl přidán obsah podporující volitelný server Illumina DRAGEN pro NextSeq 550Dx. • Bylo aktualizováno číslo součásti vzduchového filtru. <p>Změny provedené v dokumentu 1000000030326:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aktualizace provedené za účelem opravy obsahu neúmyslně přidaného ze zdrojového softwaru. • Byla přidána část Varování a preventivní opatření týkající se hlášení závažných událostí. • Do zásad postupu bylo přidáno prohlášení upřesňující zamýšleného uživatele. • Byl odebrán odkaz na sadu reagentů High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů). • Byl přidán odkaz na sadu reagentů High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů). • Byla přidána tabulka historie revizí. Byla aktualizována adresa oprávněného zástupce v EU.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva kterýchkoli třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejích příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách najdete na stránce www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australský zadavatel

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

Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které jsou uvedeny na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) pro vaši sadu.