

## Pakendi infoleht

KASUTAMISEKS IN VITRO DIAGNOSTIKAS. AINULT EKSPORDIKS.

**Katalooginumber 20005715**

## Kasutusotstarve

Seade NextSeq 550Dx on ette nähtud DNA teekide sekveneerimiseks, kui kasutatakse *in vitro* diagnostiliste analüüsidega. Seade NextSeq 550Dx tuleb kasutada spetsiifiliste registreeritud, serditud või heaks kiidetud *in vitro* diagnostikareaktiivide ja analüüsitarkvaraga.

## Protseduuri põhimõtted

Illumina Seade NextSeq 550Dx seade on mõeldud DNA teekide sekveneerimiseks *in vitro* diagnostikanalüüsidega ja ette nähtud kasutamiseks kvalifitseeritud ja kliinilises laboris tehtavate *in vitro* diagnostika protseduuride alal väljaõppe saanud personalile. Seade NextSeq 550Dx kasutab sisendina teekide, mis on loodud DNA-st, mille puhul proovide indeksid ja kinnistusjärjestused lisatakse amplifitseeritud sihtmärkidele. Proovide teegid kinnistatakse läbivooluküvetile ja sekveneeritakse seadmes sünteesi teel sekveneerimise (SBS) meetodiga. SBS-meetod kasutab pöörduvat terminaatorit, et tuvastada fluorestsentsmärgistusega üksiknukleotiidi alused nende inkorporeerimisel kasvavatesse DNA-ahelatesse. Real-Time Analysis (RTA) tarkvara analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekveneerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Kui esmane analüüs lõppeb, saab seadmel käivitada sekundaarse analüüsi aluse nimetuste töötlemiseks. NextSeq 550Dx kasutab töövoost olenevalt erinevaid sekundaarse analüüsi mooduleid. Idutee või somaatilise variandi moodulis sisaldab töötlemine demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joondamist, variandi nimetamist ja variandi nimetuste vormingufailide (VCF ja gVCF) loomist. VCF- ja gVCF-failid sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel.

## Topeltkäivituse konfiguratsioon

NextSeq 550Dx sisaldab topeltkäivituse konfiguratsiooni, mis võimaldab kasutada seadet kas diagnostikarežiimis (Dx) või kasutamiseks ainult teadusuuringute (RUO) režiimis. *In vitro* diagnostika sekveneerimisanalüüsid, sh moodulid Germline ja Somatic Variant Modules, tehakse diagnostikarežiimis. Diagnostikarežiimis saab kasutada ainult IVD sekveneerimise reaktiive. Seadme NextSeq 550Dx toimivusnäitajad ja protseduuri piirangud on määratud kasutades moodulite Germline ja Somatic Variant Modules diagnostikarežiimi.

# Protseduuri piirangud

1. Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.
2. Kasutamisel reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) või NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) saab moodulitega Germline ja Somatic Variant Module edastada järgmist:
  - sekveneerimisväljundit  $\geq 90$  gigabaasi (Gb)
  - lugemi pikkust (paaritulemuse käitusel)  $2 \times 150$  aluspaari (bp)
  - aluseid, mille väärtus on  $Q30 \geq 75\%$  või sellest suurem lugemi pikkusel  $2 \times 150$  bp  
Alustel väärtusega 75% või suurema väärtusega on Phredi skaala kvaliteediskoorid  $\geq 30$ , mis näitavad aluse nimetuse täpsust, mis on suurem kui 99,9%
3. Analüüsitarkvara ei joonda indelitega (insertioonid, deletsioonid või kombinatsioonid) lugemeid, mille sisu pikkus on  $> 25$  bp. Sellest tulenevalt ei tuvasta analüüsitarkvara indeleid, mille pikkus on  $> 25$  bp.
4. Analüüsitarkvara ei pruugi joondada äärmusliku variantse sisuga amplikoni lugemeid, mistõttu märgitakse piirkond aruandes metsiktüübiks. Äärmuslik sisu tähendab järgmist:
  - Lugemid, milles on rohkem kui kolm indelit
  - Vähemalt 30 bp pikkusega lugemid, mille üksiknukleotiidsete variantide (SNV) sisaldus on  $> 4\%$  amplikoni sihtmärgi kogupikkusest (v.a sondi piirkonnad)
  - Lugemid pikkusega  $< 30$  bp, kusjuures SNV sisaldus on  $> 10\%$  amplikoni kogupikkusest (kaasa arvatud sondipiirkonnad)
5. Suuri variante, sealhulgas mitmenukleotiidseid variante (MNV-d) ja suuri indeleid, võidakse VCF-väljundfailis märkida eraldi väiksemate variantidena.
6. Deletsioonivariante võidakse filtreerida või vahele jätta, kui ulatus on kaks paanitud amplikoni ja deletsiooni pikkus on suurem või võrdne paanitud amplikonide kattuva osaga.
7. Süsteem ei saa tuvastada indeleid, kui need esinevad vahetult praimeril kõrval ja pole kattuvat amplikoni. Analüüs ei saa tuvastada deletsioone kattuvate amplikonidega piirkondade puhul, kui deletsioon on väiksem kui tuvastatava deletsiooni suurus. Näiteks kui kahe kõrvuti asetseva amplikoni kattuvuspiirkond on kaks alust, siis ei saa analüüs tuvastada deletsioone, mis hõlmavad mõlemat alust. Mõlemas aluses on võimalik tuvastada ühe aluse deletsiooni.
8. Nagu iga hübriidsatsioonipõhise teegi ettevalmistuse puhul, võivad oligonukleotiidi siduvates piirkondades esinevad polümorfismid, mutatsioonid, insertioonid ja deletsioonid mõjutada uuritavaid allelele ja sekveneerimise ajal tehtavaid nimetamisi. Näiteks:
  - Varianti, mis on faasis praimeril piirkonnas oleva variandiga, ei pruugita amplifitseerida, mille tulemuseks on valenegatiiv.
  - Praimeril piirkonnas olevad variandid võivad takistada referentsalleeli amplifitseerimist, mille tulemuseks on vale homosügootse variandi nimetus.

- Praimerid piirkonnas olevad indelivariandid võivad lugemi lõpus praimerid kõrval põhjustada valepositiivse nimetuse.
9. Indeleid võidakse filtreerida ahela nihke tõttu, kui indelid esinevad ühe lugemi lõpu lähedal ja on joondamise ajal pehmelõigatud (soft-clipped).
10. Väikeseid MNV-sid pole valideeritud ja märgitakse ainult moodulis Somatic Variant Module.
11. Deletsioone märgitakse VCF-is eelmise aluse koordinaadis VCF-vormingu kohaselt. Seega kaaluge läheduses olevaid variante, enne kui märgite, et konkreetse aluse nimetus on homosügootne referents.
12. Mooduli Germline piirangud:
- Seade NextSeq 550Dx, mis kasutab seadmele NextSeq 550Dx mõeldud tarkvara Local Run Manager moodulit Germline Variant Module, on ette nähtud esitama idutee variantide nimetamise (nt homosügootne, heterosügootne, metsiktüüpi) kvalitatiivseid tulemusi.
  - Kui seda kasutatakse mooduliga Germline Variant, on variantide täpse nimetamise jaoks vajalik amplikoni katvus, mis on vähemalt 150x. Sellest tulenevalt on vaja 150 toetavat DNA-fragmenti, mis on võrdne 300 kattuva paarisotsalise lugemiga. Katvust mõjutavad proovide arv ja sihtaluste koguarv. Katvust võivad mõjutada GC sisaldus ja muu genoomne sisu.
  - Koopiaarvu variatsioon võib mõjutada seda, kas variant tuvastatakse homosügooti või heterosügootina.
  - Teatud korduvas kontekstis filtreeritakse VCF-failides variandid välja. Korduse filtrit RMxN kasutatakse variantide filtreerimiseks, kui variandijärjestus või selle osa esineb referentsgenoomis variandi asukoha juures korduvalt. Idutee variantide nimetamise puhul on referentsis variandi filtreerimiseks vaja vähemalt üheksa kordust. Arvesse võetakse ainult kordusi, mille pikkus on kuni 5 bp (R5x9).
  - Ühes lookuses oleva indeli ja SNV puhul märgitakse aruandes ainult üks variant.
13. Somaatilise mooduli piirangud.
- Seade NextSeq 550Dx, mis kasutab tarkvara Local Run Manager moodulit Somatic Variant Module NextSeq 550Dx, on ette nähtud esitama somaatiliste variantide nimetamise kvalitatiivseid tulemusi (nt somaatilise variandi olemasolu variandi sagedusega suurem kui või võrdne väärtusega 0,026 ja avastamispiiriga 0,05).
  - Kui seda kasutatakse mooduliga Somatic Variant Module, on variantide täpse nimetamise jaoks vajalik amplikoni katvus, mis on vähemalt 450x oligonukleotiidide kogumi kohta. Sellest tulenevalt on vaja 450 toetavat DNA-fragmenti iga oligonukleotiidide kogumi kohta, mis on võrdne 900 kattuva paarisotsalise lugemiga. Katvust mõjutavad proovide arv ja sihtaluste koguarv. Katvust võivad mõjutada GC sisaldus ja muu genoomne sisu.
  - Somaatiliste variantide nimetamise puhul on referentsis variandi filtreerimiseks vaja vähemalt kuus kordust ja arvesse võetakse ainult kordusi, mille pikkus on kuni 3 bp (R3x6).
  - Moodul Somatic Variant Module ei suuda eristada idutee variante ja somaatilisi variante. Moodul on mõeldud variantide tuvastamiseks eri variantide sageduste seast, kuid variandi sagedust ei saa kasutada idutee variandi ja somaatilise variandi eristamiseks.

- Proovis sisalduv normaalne kude mõjutab variantide tuvastamist. Kirjeldatud avastamispiir põhineb variandi sagedusel võrreldes kogu DNA-ga, mis on võetud nii kasvajasst ja normaalsest koest.

## Toote komponendid

illumina NextSeq 550Dx koosneb järgmistest osadest:

1. Seade NextSeq 550Dx (Kataloogi nr 20005715)
2. Seade NextSeq 550Dx tarkvara komponendid sisaldavad järgmist:

Tarkvararakendus	Funktsioon	Kirjeldus
Operatsioonisüsteem NextSeq 550Dx (NOS)	Juhib seadme tööd	NOS-i tarkvararakendus juhib seadme tööd sekveneerimise ajal ja loob kujutised, mida saab kasutada Real-Time Analysis (RTA) tarkvaras.
Real-Time Analysis tarkvara (RTA)	Teeb esmase analüüsi	RTA tarkvararakendus teisendab NOS-i loodud kujutised sekveneerimiskäituse tsükli iga paani jaoks aluse nimetuse failidesse, mis on sisendid Local Run Manageri analüüsimoodulite jaoks. RTA tarkvararakendus ei sisalda kasutajaliidest.
Tarkvara Local Run Manager	Moodulivaliku liides	Tarkvara Local Run Manager on seadmesse integreeritud lahendus kasutajahalduseks, sobiva analüüsimooduli valimiseks ja oleku jälgimiseks.
Somaatilise variandi moodul	Teeb sekundaarse analüüsi	See Local Run Manageri analüüsimooduli tarkvara töötleb aluse nimetusi sekundaarse analüüsiga. Analüüsimine hõlmab demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joondamist, variandi nimetamist ja aruandlust. Variandi nimetaja (Pisces) loob VCF-failid, mis sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel, ja sisaldab mõõdetud variandi sagedust.
Idutee variandi moodul	Teeb sekundaarse analüüsi	See Local Run Manageri analüüsimooduli tarkvara töötleb aluse nimetusi sekundaarse analüüsiga. Analüüsimine hõlmab demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joondamist, variandi nimetamist ja aruandlust. Variandi nimetaja (Pisces) loob VCF-failid, mis sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel, ja tuvastab iga variandi heterosügootse või homosügootsena.

3. **Valikuline** illumina DRAGEN Server NextSeq 550Dx jaoks (Kataloogi nr 20086130), sh järgmine tarkvarakomponent:

Tarkvararakendus	Funktsioon	Kirjeldus
illumina Run Manager	Rakendusmooduli valiku liides	Tarkvara illumina Run Manger on installitud valikulisesse, seadmevälisesse DRAGEN-i serverisse. illumina Run Manager võimaldab kasutajahaldust, analüüsimooduli valimist ning sekveneerimiskäituse ja analüüsi oleku jälgimist.

Valikuline illumina DRAGEN Server NextSeq 550Dx jaoks on saadaval ainult valitud riikides. Piirkondliku kättesaadavuse tagamiseks võtke ühendust illumina esindajaga.

## Töötingimused

Töötingimuste kohta lisateabe saamiseks vaadake jaotist Keskkonnakaalutlused *NextSeq 550Dx seadme töökoha ettevalmistamise juhendis (dokument nr 1000000009869)*.

Mõjur	Spetsifikatsioon
Temperatuur	Hoidke labori temperatuuri vahemikus 19 °C kuni 25 °C (22 °C ± 3 °C). See temperatuur on seadme töötemperatuur. Töötsükli ajal püüdke hoida püsivat ruumitemperatuuri, mis ei muutuks rohkem kui ±2 °C.
Õhuniiskus	Hoidke suhtelist õhuniiskust vahemikus 20–80% (mittekondenseeruv).

## Seadmed ja materjalid

### Vajalikud seadmed ja materjalid, müügil eraldi

NextSeq 550Dx Tõhus reaktiivikomplekt v2.5 (75 tsükli), kataloogi nr 20028870

NextSeq 550Dx Tõhus reaktiivikomplekt v2.5 (300 tsükli), kataloogi nr 20028871

## Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad seadmed ja materjalid

### Sekveneerimiskäituse kulutarvikud, mille hangib kasutaja

Kulutarvik	Tarnija	Otstarve
Alkoholiga puhastuslapid, 70% isopropüül või 70% etanool	VWR, kataloogi number 95041-714 (või samaväärne) Tavapärane laboritarvete tarnija	Läbivooluküveti puhastamiseks ja üldotstarbeks
Vähe kiude sisaldavad laborisalvrätid	VWR, kataloogi number 21905-026 (või samaväärne)	Läbivooluküveti puhastamiseks ja üldotstarbeks

### Seadme hoolduse kulutarvikud, mille hangib kasutaja

Kulutarvik	Tarnija	Otstarve
NaOCl, 5% (naatriumhüpoklorit)	Sigma-Aldrich, katalooginumber 239305 (või laborikvaliteediga ekvivalent)	Seadme pesemine käsitsi käitusjärgse pesuga; lahjendatuna 0,12%-ni
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalooginr P7949	Seadme pesemine käsitsi; lahjendatud 0,05%-ni
Vesi, laborikvaliteediga	Tavapärane laboritarvete tarnija	Seadme pesemine (käsitsi pesemine)
Õhufilter	illumina, katalooginumber 20063988	Õhu puhastamine, mida seade jahutamiseks võtab

## Juhised laborivee jaoks

Seadmega töötamiseks kasutage alati laborikvaliteediga või deioniseeritud vett. Ärge mitte kunagi kasutage kraanivett. Kasutage ainult järgmise kvaliteediga vett või selle ekvivalente:

- Deioniseeritud vesi
- Illumina PW1
- 18-megaoomine (MΩ) vesi
- Milli-Q vesi
- Super-Q vesi
- Molekulaarbioloogias kasutatava puhtusastmega vesi

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud



### ETTEVAATUST

USA föderaalseaduse kohaselt võib seda seadet müüa või kasutada ainult arst (või arsti korraldusel) või muu meditsiinitöötaja, kellele on oma tegevuskoha osariigi seaduse järgi väljastatud kutsetunnistus (või tema korraldusel).

1. **Mõni seadmega Seade NextSeq 550Dx kasutatav Illumina pakutav reagenti komponent sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalast lisateavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).**
2. Teatage kohe kõigist selle tootega seotud tõsistest juhtumitest ettevõttele Illumina ning kasutaja ja patsiendi osariigi pädevale asutusele.
3. Käsitsege kõiki vereproove inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV), inimese B-hepatiidi viiruse (HBV) või muude verega edasikanduvate patogeenide suhtes nakkusohtlikena (universaalsed ettevaatusabinõud).
4. Esitatud juhiste eiramine võib viia valetulemusteni või märkimisväärselt vähendada proovide kvaliteeti.
5. Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökeskkonnas. Proovide ja komplekti reagentide käsitlemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja komplekti reagentide käsitlemist peske käed põhjalikult puhtaks.
6. Korralikud laboritavad ja hea laborisisene hügieen on vajalikud, et vältida reagentide, seadmete ja genoomsete DNA-proovide saastumist PCR-i produktiga. PCR-i produktiga saastumine võib põhjustada ebatäpseid ja ebausaldusväärseid tulemusi.
7. Saastumise vältimiseks tagage, et amplifitseerimiselsetes ja -järgsetes piirkondades oleks olemas vajalik varustus ja vajalikud kulutarvikud (nt pipetid, pipeti otsakud, kütteplokid, segistid ja tsentrifuugid).

8. Proovide paarimise indeks peab vastama täpselt trükitud plaadi kujundusele. Local Run Manager täidab automaatselt proovi nimedega seotud indeksi praimerid, kui need moodulisse sisestatakse. Kasutajal soovitatakse kinnitada prooviga seotud indeksi praimerid enne sekveneerimiskäituse alustamist. Proovi ja plaadi kujunduse mittevastavus põhjustab positiivse proovi puudulikkude identifitseerimist ja tulemuste valesti esitamist.
9. Arvuti kaitsmiseks viiruste eest on tungivalt soovitatav kasutada viirustõrjetarkvara, mille hangib kasutaja. Paigaldamise juhiseid vaadake kasutusjuhendist.
10. Ärge kasutage seadet NextSeq 550Dx, kui üks paneelidest on eemaldatud. Seadme kasutamine eemaldatud paneelidega põhjustab kokkupuuteohu liinipingega ja alalisvoolupingega.
11. Ärge puudutage läbivooluküveti kambri läbivooluküveti alust. Selle kambri kütteseade töötab temperatuuril vahemikus 22 °C kuni 95 °C ja võib põhjustada põletusi.
12. Seade kaalub umbes 84 kg (185 naela) ja mahapillamisel või valekasutuse korral võib see tekitada raskeid vigastusi.

## Kasutusjuhised

Alljärgnevad juhised Seade NextSeq 550Dx nõuavad reaktiive, mis on saadaval NextSeq 550Dx tõhusas reaktiivikomplektis v2.5 (300 tsükli) või NextSeq 550Dx tõhusas reaktiivikomplektis v2.5 (75 tsükli).

## Käituse loomine

Looge sekveneerimiskäitus, kasutades Tarkvara Local Run Manager või Illumina Run Manager. Kasutusjuhised Tarkvara Local Run Manager on toodud allpool ja Seadme NextSeq 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513). Käituse loomise juhiseid, kasutades Illumina Run Manager, vt Illumina Run Manager seadmele NextSeq 550Dx Tarkvara juhend (dokument nr 200025239).

Juhiseid valiku kohta vahemikus Tarkvara Local Run Manager või Illumina Run Manager, vt Illumina Run Manager seadmele NextSeq 550Dx Tarkvara juhend (dokument nr 200025239). Täpsemaid juhiseid konkreetsete rakenduste kohta leiate konkreetse analüüsi moodulist või rakenduse juhendist.

Järgmised juhised puudutavad Tarkvara Local Run Manager idutee ja somaatilise variandi moodulite kasutamist.

## Parameetrite määramine

1. Logige sisse rakendusse Local Run Manager.
2. Valige **Create Run** (Käituse loomine) ja siis valige **Somatic Variant** (Somaatiline variant) või **Germline Variant** (Idutee variant).
3. Sisestage käituse nimi, mis identifitseerib käituse sekveneerimisest analüüsini. Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.
4. [Valikuline] Sisestage käituse kirjeldus, et aidata käitust identifitseerida. Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.



5. Valige rippmenüüst proovide arv ja indeksikomplekt.  
Mõelge valiku tegemisel järgmisele teabele.
  - Rippmenüü sisaldab proovide arvu, millel on indeksikomplekt. Näiteks 24-komplekt 1 tähistab 24 testitavat proovi koos indeksikomplekti 1 indeksitega.
  - Indeksikomplekti numbrid viitavad erinevatele i5 ja i7 indeksipaaride komplektidele. Komplekt 1 ja komplekt 2 pakuvad indeksite mitmekesisust. Pakutakse kahte indeksikomplekti, mis aitavad vältida ühe komplekti ammendumist.
  - Valige proovide arv, mis on lähim testitavate proovide arvule. Kui loendis täpset proovide arvu pole, valige testimiseks vajalikule lähim, kuid proovide arvust väiksem arv. Näiteks kui soovite testida 18 proovi, valige 16 proovi.
  - Indeksi mitmekesisuse nõuetele vastavad soovitatud proovide kaevud ja indeksikombinatsioonid on esile tõstetud rohelisega.

### Manifestifailide importimine käituse jaoks

1. Veenduge, et imporditavad manifestid oleksid kättesaadavad juurdepääsetavas võrgus või USB -draivil.
2. Valige **Import Manifests** (Impordi manifestid).
3. Liikuge manifestifaili juurde ja valige manifestid, mida soovite lisada.

#### MÄRKUS

Manifestifailide kättesaadavaks tegemiseks kõigi käituste jaoks, kasutades idutee või somaatilise variandi analüüsimoodulit, lisage manifestid funktsiooni Mooduli sätteid abil. See funktsioon nõuab administraatori taseme õigusi. Lisateavet vt *Seadme NextSeq 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

### Proovide määramine käituse jaoks


Määrake käituse proovid, kasutades üht valikutest ja järgnevaid juhiseid.

**Enter samples manually** (Proovide sisestamine käsitsi) – kasutage tühja tabelit kuval Create Run (Käituse loomine).


**Import samples** (Proovide importimine) – liikuge komaeraldusega väärtuste (\*.csv) vormingus välise faili juurde. Malli saab alla laadida kuvalt Create Run (Käituse loomine)

### Proovide sisestamine käsitsi

1. Sisestage kordumatu proovi nimi (*Somatic Variant Analysis Module*) või proovi ID (*Germline Variant Analysis Module*).  
Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
2. [Valikuline] Positiivsete või negatiivsete kontrollproovide jaoks paremklõpsake ja valige kontrollitüüp.  
Ühes proovikaevus sisalduv kontroll täidab teise kogumi vastava kaevu sama kontrolliga.

- [Valikuline] Sisestage väljale Sample Description (Proovi kirjeldus) proovi kirjeldus. Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
- Valige indeksi 1 adapter rippmenüüst Indeks 1 (i7).  
Soovitatud proovide kaevude kasutamisel täidab tarkvara i7 ja i5 indeksiaadapterid, mis vastavad indeksi mitmekesisuse nõuetele. Kui loendis pole täpset testitavate proovide arvu, valige lisakaevude jaoks kindlasti indeksiaadapterid.
- Valige indeksi 2 adapter rippmenüüst Indeks 2 (i5).
- Valige rippmenüüst Manifest manifestifail.  
A-kogumi proovid nõuavad teistsugust manifesti kui proovid B-kogumist.
- Valige suvand plaadi kujunduse vaatamiseks, printimiseks või salvestamiseks viitena teekide ettevalmistamisel:
  - Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon  **Print** (Prindi). Valige **Print** (Prindi), et printida plaadi paigutus.
  - Valige **Export** (Ekspordi), et eksportida proovi teave välisesse faili.
- Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

## Proovide importimine

- Valige **Import Samples** (Impordi proovid) ja sirvige proovi teabefaili asukohta. Imporditavaid faile on kaht tüüpi.
  - Uue plaadikujunduse tegemiseks valige **Template** (Mall) kuval Create Run (Käituse loomine). Mallifail sisaldab impordiks õigeid veerupäiseid. Sisestage igas veerus käituses olevate proovide kohta proovi teave. Kustutage näidisteave kasutamata lahtritest ja seejärel salvestage fail.
  - Kasutage idutee variandi või somaatilise variandi moodulist ekspordifunktsiooni abil eksporditud proovide teabega faili.
- Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon  **Print** (Prindi).
- Valige **Print** (Prindi), et printida plaadi kujundus teekide ettevalmistamise näidisenäidisena.
- Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

## Reaktiivikasseti ettevalmistamine

Edukaks sekveneerimiseks järgige kindlasti hoolikalt reaktiivikasseti juhiseid.

- Võtke reaktiivikassett -25 °C kuni -15 °C hoiuruumist välja.
- Valige reaktiivide sulatamiseks üks järgmistest meetoditest. Ärge pange kassetti üleni vee alla. Pärast kasseti sulatamist kuivatage seda enne järgmise etapi juurde liikumist.

Temperatuur	Sulatamise aeg	Stabiilsuspiir
15–30 °C vesivann	60 minutit	Mitte kauem kui 6 tundi
2 °C kuni 8 °C	7 tundi	Mitte kauem kui 5 päeva

**MÄRKUS** Kui ühes vesivannis sulab korraga rohkem kui üks kassett, sulatage kassette kauem.

3. Pöörake kassetti viis korda ümber, et reaktiivid seguneksid.
4. Kontrollige kasseti põhja ja veenduge, et reaktiivid oleksid sulanud ja et tekkinud poleks sadet. Veenduge, et positsioonid 29, 30, 31 ja 32 oleksid sulanud, kuna need on kõige suuremad ja nende sulamiseks kulub kõige rohkem aega.
5. Õhumullide vähendamiseks koputage õrnalt vastu töölauda.  
Parimate tulemuste saavutamiseks jätkake kohe proovi laadimise ja käituse seadistamisega.

## Läbivooluküveti ettevalmistamine

1. Võtke läbivooluküveti karp 2 °C kuni 8 °C hoiuruumist välja.
2. Eemaldage karbilt fooliumpakend ja pange 30 minutiks toatemperatuurile seisma.

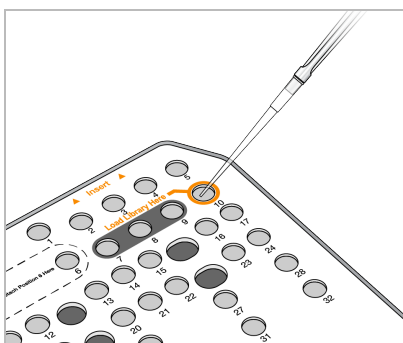
## Teekide ettevalmistamine sekveneerimiseks

Denatureerige ja lahjendage teeke laadimismahuni 1,3 ml. Praktikas erinevad laadimiskontsentratsioonid sõltuvalt teegi ettevalmistamise ja kvantifitseerimise meetoditest. Prooviteekide lahjendus oleneb oligonukleotiidide kogumite kompleksusest. Juhised prooviteegi ette valmistamiseks sekveneerimiseks, sh teegi lahjendamiseks ja liitmiseks, leiata vastava teegi ettevalmistuskomplekti kasutusjuhendi jaotisest. Vajalik on klastri tiheduse optimeerimine NextSeq 550Dx seadmes.

## Teekide laadimine reaktiivikassetti

1. Puhastage ebamevaba salvrätiga fooliumtihend, mis katab mahutit nr 10 sildiga **Load Library Here** (Laadige teek siia).
2. Läbistage tihend puhta 1 ml pipeti otsakuga.
3. Laadige 1,3 ml valmistatud teeke mahutisse nr 10 sildiga **Load Library Here** (Laadige teek siia). Teekide laadimisel vältige fooliumtihendi katsumist.

joonis 1 Teekide laadimine



## Sekvenerimiskäituse seadistamine

Täieliku käituse seadistamise juhiseid vt Seadme NextSeq 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513).

1. Logige seadmesse NextSeq 550Dx tarkvara Local Run Manager või Illumina Run Manager tarkvara parooliga.

2. Valige NOS-i tarkvara Home screen (avakuval) suvand **Sequence** (Sekvents).

3. Valige loendist käitus ja valige suvand **Next** (Edasi).

Seeria käituse seadistuskuvast avatakse järgmises järjekorras: Laadige läbivooluküvett, laadige puhvrikassett, laadige reagendikassett ja eelkäituse kontroll.

### MÄRKUS

Tulemused on kättesaadavad ainult sama käituse halduriga, mida kasutatakse käituse planeerimisel. Run Manageri tarkvara seadistamise juhiseid vt Illumina Run Manager seadmele NextSeq 550Dx Tarkvara juhend (dokument nr 200025239).

4. Kui avaneb ekraan Load Flow Cell (Läbivooluküveti laadimine), puhastage ja seejärel laadige läbivooluküvett.

- Eemaldage läbivooluküvett fooliumpakendist.
- Avage läbipaistev kaanega plastkarp ja võtke läbivooluküvett välja
- Puhastage läbivooluküveti klaaspinda ebemevaba alkoholilapiga. Kuivatage klaas ebemevaba laboripaberiga
- Veenduge, et läbivooluküveti klaaspind oleks puhas. Vajaduse korral puhastage uuesti.
- Eemaldage eelmises käituses kasutatud läbivooluküvett.
- Joondage läbivooluküvett üle joondustihvtide ja asetage läbivooluküvett paika.

5. Valige käsk **Load** (Laadi).

Uks sulgub automaatselt, ekraanil kuvatakse läbivooluküveti ID ja kontrollitakse andureid.

6. Kasutatud reaktiivimahutite tühjendamiseks, seadme NextSeq 550Dx puhvrikasseti laadimiseks ja seadme NextSeq 550Dx reaktiivikasseti laadimiseks järgige tarkvara viipasid.

Kui seadme NextSeq 550Dx puhvri- ja reaktiivikassetid on laaditud, loeb ja jäädvustab tarkvara RFID. Puhvri- ja reaktiivikasseti ID kuvatakse ekraanil ja kontrollitakse andureid.

7. Kui automaatne eelkäituse kontroll on lõppenud, valige käsk **Start** (Alusta). (Pole vaja, kui seadistatud on automaatne algus.)

8. Kui käitus algab, kuvatakse ekraan Sequencing (Sekvenerimine). Ekraanil kujutatakse pooleliolevat käitust, sh intensiivsusi ja kvaliteediskoore (Q-skoorid).

# Tulemused

Real-Time Analysis (RTA) on integreeritud tarkvara, mis analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekveneerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Kui esmane analüüs lõppeb, valitud moodul automaatselt sekundaarse analüüsiga. Siin kirjeldatud sekundaarse analüüsi protsessid on mõeldud moodulite Tarkvara Local Run Manager Germline ja Somatic Variant Seade NextSeq 550Dx jaoks.

## Demultipleksimine

Demultipleksimine võrdleb iga indeksi lugemi järjestust käituse jaoks määratud indeksite järjestustega. Selles etapis ei arvestata kvaliteediväärtustega.

Indeksite lugemid identifitseeritakse järgmiste sammudega:

- Proovid nummerdatakse alates 1-st, lähtudes nende järjestusest käituse jaoks.
- Valimi number 0 on reserveeritud klastritele, mida proovile ei määratud.
- Klastrid määratakse proovile siis, kui indeksi järjestus vastab täpselt või kui indeksi lugemi kohta on kuni üks mittevastavus.

## FASTQ-failide genereerimine

Pärast demultipleksimist genereerib tarkvara vaheanalüüsi failid FASTQ-vormingus, mis on tekstivorming, mida kasutatakse järjestuste esitamiseks. FASTQ-failid sisaldavad kõikide proovide lugemeid ja seonduvaid kvaliteediskoore. Klastrid, mis ei läbinud filtrit, on välistatud.

FASTQ-fail sisaldab ainult ühe proovi lugemeid ja selle proovi nimi sisaldub FASTQ-faili nimes. Idutee ja somaatilise variandi moodulites luuakse iga oligokogumi proovi kohta kaheksa FASTQ-faili, neli lugemist 1 ja neli lugemist 2. Selle väljundi tulemuseks on idutee ja somaatilise variandi puhul kokku 8 ja 16 FASTQ-faili proovi kohta. FASTQ-failid on joondamise peamine sisend.

## Joondamine

Joondamisetapi ajal joondab Smith-Watermani ribaalgoritm iga proovi klastrid manifestifailis täpsustatud amplikonjärjestuste kohaselt.

Smith-Watermani ribaalgoritm teostab semiglobaalseid järjestuste joondusi, et määrata sarnased piirkonnad kahele järjestusele. Kogu järjestuse võrdlemise asemel võrdleb Smith-Watermani algoritm kõigi võimalike pikkustega segmente.

Iga paaristulemusega lugemit hinnatakse selle joondamise suhtes selle lugemi asjakohaste sondijärjestustega.

- 1. lugemit hinnatakse allavoolu lookusekohaste oligode (DLSO) pöördkomplementi suhtes.
- 2. lugemit hinnatakse ülesvoolu lookusekohaste oligode (ULSO) suhtes.

- Kui lugemi algus ühtib sondijärjestusega, milles pole rohkem kui kolm erinevust, joondatakse lugemi täispikkus selle järjestuse amplikoni sihtmärgi suhtes.
- Kui lugemi algus ühtib sondijärjestusega, milles pole rohkem kui kolm erinevust (mittevastavus või nihked juhtivate indelide tõttu), joondatakse lugemi täispikkus selle järjestuse amplikoni sihtmärgi suhtes.
- Analüüsikeemiat arvestades DLSO-s ja ULSO-s indeleid ei täheldata.

Joondused filtreeritakse joondamistulemuste põhjal, lähtudes mittevastavuse määrast kas huvipakkuvas piirkonnas või kogu amplikonis, olenevalt amplikoni pikkusest. Filtreeritud joondused kirjutatakse joondusfailidesse joondamata ja neid ei kasutata variantide nimetamisel.

## Variandi nimetamine

Variandi nimetaja Pisces on kavandatud looma SNV ja indeli variandi nimesid seadme jaoks ette valmistatud teekidest.

## Aruanded ja täiendavad väljundfailid

Variandi analüüsimooduli protseduuri PDF ja tabeleraldusega (\*.txt) aruanded, kus kuvatakse mõõdikud, nagu sekveneerimissügavus ja variantide arv. Moodulid loovad ka väljundfailid, nagu VCF-i ja genoomi variantide nimetamise vormingus (gVCF) failid variandi nimetamiseks.

## Kvaliteedikontrolli protseduurid

Tarkvara NextSeq 550Dx hindab iga käitust, proovi ja aluse nimetust, võrreldes neid kvaliteedikontrolli mõõdikutega. Positiivseid ja negatiivseid kontrollmaterjale on soovitatav kasutada ka teekide ettevalmistamises ja neid tuleb hinnata. Hinnake kontrollmaterjale järgmiselt:

- **Negatiivne kontrollmaterjal (malli kontrollmaterjal puudub) või muu negatiivne kontrollmaterjal** — peab andma eeldatava tulemuse. Kui negatiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises, indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud või tekkinud on saastumine.
- **Positiivne kontrollproov** — peab andma eeldatava tulemuse. Kui positiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises või indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud.

## Toimivusnäitajad

Seade NextSeq 550Dx toimivusnäitajad tuvastati moodulitega Germline ja Somatic Variant Module komplektidega TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ning

kinnitati kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Uuringud sisaldasid proovi indekseerimist, proovi ülekandumist, DNA sisendit, analüütilist tundlikkust (kriitiline väärtus / avastamispiir), täpsust, kordustäpsust, meetodi võrdlust ja korratavust.

Reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) varem saadud toimivusandmete hindamiseks tehti analüütilised uuringud reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Tulemused näitavad, et reaktiivikomplektide (v2 ja v2.5) toimivus on võrreldav kasutamisel komplektiga TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajaid, nagu eraldamismeetod või segavad ained, vaadake *komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pakendi teabeleht*.

## Toimivusnäitajatel kasutatud arvutuste definitsioonid

1. Positiivse protsendi ühtivus (PPA) arvutatakse referentsmeetodiga variantidena klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
  - $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate variandi lookuste arv}) / (\text{variandi lookuste koguarv})$   
Analüüsi esitatavad variandi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt positiivsed (TP-d). Referentsnimetuste või erineva variandi nimetusena analüüsi poolt esitatavad variandi lookused on valenegatiivsed (VN-id).
2. Negatiivse protsendi ühtivus (NPA) arvutatakse referentsmeetodiga metsiktüübiks klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
  - $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate metsiktüüpi lookuste arv}) / (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv})$   
Analüüsi esitatavad metsiktüüpi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt negatiivsed (TN-id). Analüüsi poolt variantidena esitatavad metsiktüüpi lookused on valepositiivsed (VP-d).
3. Üldine protsendi ühtivus (OPA) arvutatakse lookuste osakaaluna, mida analüüs referentsmeetodi suhtes õigesti esitab.
  - $((\text{Analüüsi poolt õigesti esitatud variandi lookuste arv}) + (\text{analüüsi poolt õigesti esitatud metsiktüüpi lookuste arv})) / ((\text{variandi lookuste koguarv}) + (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv}))$
4. PPA, NPA ja OPA arvutused ei sisalda nimetusi (variant või referentslookus ei vasta ühele või mitmele kvaliteedifiltrile).
5. Autosoomne nimetuse määr arvutatakse, jagades lookuse läbipääsufiltrite koguarvu kromosoomide 1–22 jaoks sekveneeritud positsioonide koguarvuga; kromosoomid X ja Y jäetakse arvutusest välja. See mõõdik ei võta arvesse nimetuste ühtivust referentsmeetodiga.

# Reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) toimivus

## Proovi indekseerimine

Teegi ettevalmistamise ajal lisatavad proovi indeksi praimerid määravad igale proovi DNA-le kordumatu järjestuse. Need kordumatud järjestused võimaldavad koondada ühte sekveneerimiskäitusesse mitu proovi. Proovi indekseerimist kasutatakse nii idutee kui ka somaatilise töövooga jaoks. Selle uuringu eesmärk oli tuvastada minimaalne (8) ja maksimaalne (96) proovide arv, mida saab töödelda seadmega Seade NextSeq 550Dx ühes sekveneerimiskäituses. Kaheksat kordumatut Platinum Genome'i proovi analüüsiti 12 eri indeksi praimerite kombinatsiooniga proovi kohta. Mooduli Germline Variant Module abil tehtud nelja sekveneerimiskäituse proovi tulemusi võrreldi Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0.

Käituste esimeses komplektis analüüsiti 96 kordumatut indekseeritud prooviteeki näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses ahela kohta kõigis 23 inimkromosoomis, et kontrollida analüüsi suutlikkust järjekindlalt moodustada genotüübi nimetusi konkreetse proovi kohta indeksi praimerite eri kombinatsioonides. Käituste teises komplektis sekveneeriti kaheksat kordumatut indekseeritud prooviteeki kahes sekveneerimiskäituses, et kontrollida toetatud indeksite miinimumarvu.

96 indeksiga käitustes oli SNV-de PPA vahemikus 98,7% kuni 100%, insertioonide ja deletsioonide PPA oli 100% ning NPA oli 100% iga 96 indeksi kombinatsiooni korral. Kaheksa indeksiga käitustes olid kõigi kaheksa indeksi kombinatsiooni PPA väärtused 100% (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) ja NPA väärtused 100%.

## Proovi ülekandumine

Seadmega NextSeq 550Dx saab sekveneerida mitut proovi ja kontrollmaterjale ühes sekveneerimiskäituses. Uuring viidi läbi proovi ülekande ulatuse hindamiseks ühes sekveneerimiskäituses (käitusesisene) ja sekveneerimiskäituste vahel (käitustevaheline). Mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsi abil, mis katab 12 588 bp (150 ampliconi) 23 eri kromosoomis (sh mõlemad sugukromosoomid), analüüsiti kaht Platinum Genome'i proovi (üks mehe ja üks naise proov). Teeke sekveneeriti seadmel NextSeq 550Dx, kasutades selleks moodulit Germline Variant Module. Isasproovide ülekandumist emasproovidesse täheldati Y-kromosoomi ampliconi lugemite olemasolu tõttu emasproovides.

Käitusesisene ülekandumine võib tekkida klastrite loomisel, indeksi tsükli aluse nimetamisel ja proovi demultipleksimisel. Proovi ülekande analüüsimiseks sekveneerimiskäituse sees sekveneeriti iga isas- ja emasproovi 46 replikaadist ja lisaks neljast puuduva malliga kontrollmaterjalist koosnevat teegikogumit üks kord seadmes NextSeq 550Dx. Käitusesisest proovi ülekandumist hinnati, selleks võrreldi iga emasreplikaadi Y-kromosoomi ampliconi katvust kõigi kogumis olevate isasreplikaatide Y-kromosoomi ampliconi katvusega. Käitusesisese ülekande mediaanväärtus oli 0,084%.

Käitustevahelise ülekande analüüsimiseks valmistati ette kaks teegikogumit ja neid sekveneeriti järjestikku ühes NextSeq 550Dx-i seadmes. Esimene kogum sisaldas emasproovide 46 replikaati ja lisaks kaht puuduva malliga kontrollmaterjali. Teine kogum sisaldas isasproovide 46 replikaati ja lisaks kaht puuduva malliga kontrollmaterjali. Mõlema kogumiga kasutati sama indeksadapterite komplekti. Emaskogumit sekveneeriti esimesena, millele järgnes isaskogumi sekveneerimiskäitus, millele omakorda järgnes emaskogumi



sekveneerimiskäituse kordus. Käitustevahelist proovi ülekandumist analüüsiti, selleks võrreldi Y-kromosoomi ampliconi katvust emaskogumi korduskäituse ja isaskogumi käituse vastavate replikaatide vahel. Käitustevahelise ülekande mediaanväärtus oli 0,0076%

## DNA sisend

### Veri (Germline)

Seade NextSeq 550Dx jaoks tehti kindlaks vere DNA sisendi vahemik komplekti TruSeqCustom Amplicon Kit Dx teegi ettevalmistuses, kasutades mooduli Germline Variant Module töövoogu. Seda vahemikku hinnati järjestikuste lahjenduste katsega, kasutades 13 Platinum Genome'i proovi, mida analüüsiti mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsiga, mis katab 12 588 bp piirkonda 23 eri kromosoomis. Teeki sekveneeriti kahel NextSeq 550Dx-i seadmel, kasutades üht reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) partiid.

Viit proovi analüüsiti duplikaatidena viiel DNA sisendi tasemel vahemikus 250 ng kuni 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ja 12 ng). Kaheksat proovi analüüsiti ühe replikaadina igal viiest DNA sisendi tasemest. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi genotüüpe Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Tulemused määrati iga sisendtaseme kohta. Iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) PPA on toodud [tabel 1](#); NPA on toodud [tabel 2](#). Kõigi sisendtasemete täpsus oli sarnane. Komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx soovituslik DNA sisend on 50 ng, vastavalt ülem- ja alampiiriga 25 ng ja 100 ng, et olla vastavuses toimivusnäitajatega.

tabel 1 Iga DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi

DNA sisend (ng)	Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetusetu variant	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Insertsioon	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	Deletsioon	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

tabel 2 NPA iga DNA sisendi kohta

DNA sisend (ng)	TN	VP	Nimetuseta referents	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

### FFPE (moodul Somatic)

Seadme NextSeq 550Dx jaoks tehti kindlaks formaliiniga fikseeritud parafiinis (FFPE) DNA sisendi vahemik komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx teegi ettevalmistuses, kasutades mooduli Somatic Variant Module töövoogu. DNA sisendi vahemikku hinnati järjestikuste lahjenduste katsega, kasutades kolme Platinum Genome'i proovi, mida analüüsiti mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsiga, mis katab 12 588 bp piirkonda 23 eri kromosoomis. Platinum Genome'i rakuliinid GM12878 ja GM12877 fikseeriti formaliinis ja sisestati parafiini, seejärel eraldati DNA. GM12878 lahjendati GM12877-ga, nii et 79 variandi (55 SNV-d, 9 insertiooni ja 15 deletsiooni) variantalleeli sagedused (VAF-id) olid väärtuse 0,025, 0,05, või 0,10 ligiduses. Peale selle oli igal proovil 91 varianti kõrgema variandi sagedusega, kuni 1,0 VAF. Proove töödeldi duplikaatidena viiel DNA sisendi tasemel, keskmise delta kvantitatiivse tsükli (dCq) väärtustega 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 ja 7,8, mõõdetuna komplektiga TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC Kit. Iga teeki sekveneeriti kahel NextSeq 550Dx-i seadmel, kasutades kaht seadme reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) partiid. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi variandi nimetamisi Platinum Genome'i versiooniga 2016–1,0. Iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) PPA on toodud tabel 3; NPA on toodud tabel 4. VAF-iga 0,05 või kõrgemal väärtusel variantide soovituslik DNA sisend on dCq ≤ 4 alampiiriga 4,6, et vastata toimevõime näitajatele.

tabel 3 Iga DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi

Keskmine dCq	Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	Eeldatavad puuduvad nimetused	Sihtlahjenduse VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Nimetuseta variant	PPA (%)	Nimetuseta variant	PPA (%)	Nimetuseta variant	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ei kohaldata.	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	Insertsioon	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	Deletsioon	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

tabel 4 NPA iga DNA sisendi kohta

Keskmine dCq	Eeldatav metsiktüüp	Sihtlahjenduse VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Nimetuseta referents	NPA (%)	Nimetuseta referents	NPA (%)	Nimetuseta referents	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

## Analüütiline tundlikkus (kriitiline väärtus (LoB) ja avastamispiir (LoD))

See uuring viidi läbi, et hinnata somaatilise variandi mooduli kriitilist väärtust (LoB) ja avastamispiiri (LoD) seadmel NextSeq 550Dx. See viidi läbi näitliku analüüsiga, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses 23 eri kromosoomis. Platinum Genome'i rakuliinid GM12878 ja GM12877 fikseeriti formaliinis ja sisestati parafiini, seejärel eraldati DNA. GM12878 lahjendati GM12877-ga, nii et 74 variandi (53 SNV-d, 7 insertsiooni ja 14 deletsiooni) variandi sagedus olid  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 ja lahjendatud GM12878 (GM12878-D) analüüsiti kuuel järjestikusel päeval ühe seadmega, kasutades vaheldumisi kaht reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) partiid, kokku tehti kuus sekveneerimiskäitust. See analüüs andis iga variandi kohta 60 replikaati GM12878-D korral ja 72 replikaati iga vastava metsiktüüpi koordinaadi kohta GM12877 korral iga reaktiivikomplekti kohta. LoB ja LoD arvutati protokollis CLSI EP17-A2 esitatud klassikalise lähenemisega, kasutades mitteparameetrilist valikut. LoB ja LoD arvutati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta eraldi, koondades konkreetse variandi tüübi variandi sagedused. I tüüpi viga määrati väärtusega 0,01 ja II tüüpi viga väärtusega 0,05.

LoB jaoks sortiti koondatud variandi sagedused madalaimast kõrgeimani ja arvutati iga variandi tüübi iga reaktiivikomplekti 99. järgu positsioon (tabel 5). Moodul Somatic Variant Module kasutab variantide kvalitatiivseks tuvastamiseks piirväärtust (tegelik LoB) 0,026 VAF. Arvutatud LoB kinnitas, et see piirväärtus annab tulemuseks I tüüpi vea, mille väärtus pole suurem kui 0,01.

tabel 5 Kriitiline väärtus

Variandi tüüp	Vaatlusi kokku	LoB reaktiivipartii 1 (%)	LoB reaktiivipartii 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insertsioon	504	0,56	0,56
Deletsioon	1008	1,20	1,20

LoD jaoks arvutati piirväärtusest 0,026 allapoole jäävate kõigi variandi tüüpide iga reaktiivikomplekti individuaalse mutatsiooni sageduse protsent (tabel 6). Kuna protsendid olid madalamad kui II tüüpi viga 5% (0,05), arvutati liidetud variandi sagedused LoD-na (tabel 6). Iga variandi tüübi LoD võeti kahe reaktiivikomplekti kohta arvutatud kahest väärtusest suuremana – 4,97% SNV-de korral, 5,12% insertsioonide korral ja 5,26% deletsioonide korral.

tabel 6 Avastamispiir

Reaktiivipartii	Variandi tüüp	Vaatlusi kokku	VAF-mõõtmiste arv < 2,6%	VAF-mõõtmiste % < 2,6%	Avastamispiir (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insertsioon	420	6	1,4	5,08
	Deletsioon	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insertsioon	420	5	1,2	5,12
	Deletsioon	840	7	0,80	5,26

## Täpsus

### Moodul Germline

Läbi viidi järgmine uuring, et hinnata seadme Seade NextSeq 550Dx mooduli Germline Variant Module variandi nimetuse täpsust, kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli). Analüüsiti 13 kordumatut Platinum Genome'i proovi, kasutades representatiivset analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 bp (150 ampliconi) ulatuses 23 eri kromosoomis. Kokku tehti üheksa käitust, kasutades viie päeva jooksul kolme sekveneerimisseadet, kolme reaktiivipartiid ja kolme operaatorit. Täpsus määrati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta, selleks võrreldi tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Usaldusväärsed genoomsed piirkonnad määrati selle referentsmeetodi põhjal, kui pole öeldud teisiti.

tabel 7 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Vaatlusi kokku <sup>1</sup>	Tulemus vaatluse järgi <sup>2</sup>	Tulemus käituse järgi <sup>3</sup>
SNV PPA	819	98,7	>99,9
Insertsioonide PPA	819	95,0	98,9
Deletsioonide PPA	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta (91) × käituste arv (9) = 819.

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõigis üheksas käituses.

<sup>3</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

tabel 8 sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0 PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertsioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertsioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

tabel 8 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta

Proov	Keskmine nimetuse määr	Eeldatavad variandid <sup>1</sup>	TP	VN	Nimetuseta variant	TN	VP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

<sup>1</sup> Variantide koguarv kõikides proovi replikaatides kõigis üheksas käituses.

tabel 9 sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferensmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

tabel 9 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal

Proov	SNV-d			Insertioonid			Deletsioonid		
	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Proove analüüsiti väikeste insertioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas. Üldine kokkuvõte on toodud tabel 10. Kokku oli 71 indelit suurusega vahemikus 1–24 bp (insertioonid) ja 1–25 bp (deletsioonid).

tabel 10 Mooduliga Germline tuvastatud indelite kokkuvõte

Variant Tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	PPA
Insertioon	18522	18018	27	477	99,9
Deletsioon	17388	17073	0	315	100

Näitlik analüüs koosnes 150 amplikonist, mis on mõeldud katma mitmesugust genoomset sisu. Amplikonide GC sisaldus oli vahemikus 0,19–0,87. Amplikonidel oli ka mitmeid erinevaid üksiknukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed pandi kokku amplikonipõhiselt (tabel 11), et määrata genoomse sisu mõju õigete nimetuste protsendile. Õigete nimetuste osakaal sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on alla 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvad nimetusi.

tabel 11 Mooduliga Germline saadud andmete täpsus amplikoni tasemel

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Polü A (5), Polü C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Polü G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Polü T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Polü A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ei kohaldu	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Polü A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Polü T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Polü T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Polü T (5), Polü A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Polü T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ei kohaldu	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Polü A (5), Polü T (5), Polü A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Polü A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Polü G (6), Polü T (5), Polü A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ei kohaldu	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Polü A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Polü A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Polü A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Ei kohaldu	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Ei kohaldu	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Polü A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Polü T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Polü G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Polü T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Polü C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Polü G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Polü A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ei kohaldu	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Polü A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Polü G (5), indel	0,62	73710	0	0	100



Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
48	7	149503875	149503965	91	91	Polü G (6), Polü C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ei kohaldu	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ei kohaldu	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Polü G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Polü G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Ei kohaldu	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Polü C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Polü G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Polü T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Polü A (5), Polü T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Ei kohaldu	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ei kohaldu	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ei kohaldu	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ei kohaldu	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ei kohaldu	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Polü A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Ei kohaldu	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Polü G (6)	0,55	74529	0	0	100

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Polü A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Polü C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Polü A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ei kohaldu	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Polü A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Polü G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Ei kohaldu	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Polü A (5), Polü T (7), Polü A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ei kohaldu	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Polü T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Polü A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Polü C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Polü G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Polü T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ei kohaldu	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Ei kohaldu	0,27	51597	0	0	100

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
102	16	28997904	28997998	95	95	Polü C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Polü C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Polü T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Polü C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Polü T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Polü A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Polü A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Polü A (7), AT(3), AT (4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Polü T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ei kohaldu	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Polü A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Polü A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ei kohaldu	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ei kohaldu	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Ei kohaldu	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Ei kohaldu	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ei kohaldu	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Polü G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Polü T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Polü A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Polü T (5), Polü A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Ei kohaldu	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ei kohaldu	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Polü T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Polü C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ei kohaldu	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ei kohaldu	0,55	0	0	0	Ei kohaldu
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ei kohaldu	0,48	0	0	0	Ei kohaldu
150	Y	2655609	2655679	71	0	Polü A (5)	0,37	0	0	0	Ei kohaldu

Proovi NA12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (NIST (v.2.19). 150 amplikonist 92 sisaldasid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 41 amplikonil oli osaline kattuvus ja 17 amplikonil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 10 000 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on toodud tabel 12.

tabel 12 Proovi NA12878 mooduliga Germline saadud andmete ühtivus NIST andmebaasiga

Proov	Amplikonide arv	Keskmine nimetuse määr	TP	VN	TN	VP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Selle üheksa käitusega mooduli Germline uuringu andmete põhjal saab seadmega Seade NextSeq 550Dx järjekindlalt sekveneerida järgmist:

- GC sisaldus  $\geq 19\%$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 19% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,6%)
- GC sisaldus  $\leq 87\%$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 87% nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- PolüA pikkused  $\leq 9$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 9-nukleotiidset PolüA kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- PolüT pikkused  $\leq 10$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 10-nukleotiidset PolüT kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- PolüG pikkused  $\leq 7$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 7-nukleotiidset PolüG kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,0%)
- PolüC pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 2457 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüC kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)
- Dinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 11x$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 11x dinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- Trinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 5x$  (kõik nimetatud alused 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 5x trinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- Insertioonide pikkused  $\leq 24$  (66343 66370-st nimetatud alusest 819 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 24-nukleotiidset insertiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,2%; 24-nukleotiidset insertiooni sisaldas piirkonnas ei esinenud valesid nimetusi)
- Deletsioonide pikkused  $\leq 25$  (kõik nimetatud alused 2457 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 25-nukleotiidset deletsiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumisi polnud)

## Moodul Somatic

Siin kirjeldatud uuringut kasutati mooduli Somatic Variant Module variandi nimetamise täpsuse hindamiseks Seade NextSeq 550Dx seadmes, kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli).

Uuringus kasutati näitlikku analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 aluses (150 amplikonis) 23 eri kromosoomis. Platinum Genome'i DNA eraldati FFPE-ga töödeldud plokkidest, et luua kuus kordumatut proovi selles uuringus hindamiseks.

Proovi GM12877 DNA-d lahjendati proovi GM12878 DNA-ga, et luua GM12877-D5 ja GM12877-D7 kordumatute heterosügootsete variantide kogumina variandi sagedusega väärtuste 5% ja 7% lähedal. Proovi GM12878 DNA-d lahjendati sarnaselt proovi GM12877 DNA-ga, et luua GM12878-D5 ja GM12878-D7. Kõiki proove analüüsiti kolmes eksemplaris, v.a lahjendatud proove, mida analüüsiti kuue replikaadina. Kokku tehti üheksa käitust, kasutades viie päeva jooksul kolme sekveneerimisseadet, kolme reaktiivipartiidi ja kolme operaatorit. Täpsus määrati SNV-de, insertioonide ja deletsioonide kohta, selleks võrreldi tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Usaldusväärsed genoomsed piirkonnad määrati selle referentsmeetodi põhjal, kui pole öeldud teisiti.

tabel 13 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Vaatlusi kokku <sup>1</sup>	Tulemus vaatluse järgi <sup>2</sup>	Tulemus käituse järgi <sup>3</sup>
SNV PPA	378	98,9	99,9
Insertsioonide PPA	378	96,9	99,9
Deletsioonide PPA	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta (42) × käituste arv (9) = 378.

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõigis üheksas käituses.

<sup>3</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

tabel 14 sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

tabel 14 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta

Proov	Keskmine nimetuse määr	Eeldatav	TP	VN	Nimetuseta variant	TN	VP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9

Proov	Keskmine nimetuse määr	Eeldatav	TP	VN	Nimetuseta variant	TN	VP	PPA	NPA	OPA
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

tabel 15 sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferensmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

tabel 15 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal

Proov	SNV-d			Insertioonid			Deletsioonid		
	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Kümnet proovi analüüsiti väikeste insertioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas (tabel 16). Kokku oli 71 indelit suurusega vahemikus 1–24 bp (insertioonid) ja 1–25 bp (deletsioonid).

tabel 16 Mooduliga Somatic tuvastatud indelide kokkuvõte

Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	PPA
Insertsioon	10773	10282	9	482	99,2
Deletsioon	11502	10667	5	830	>99,9



150 amplikoni olid ette nähtud katma mitmesugust genoomset sisu. Amplikonide GC sisaldus oli vahemikus 0,19–0,87%. Amplikonidel oli ka mitmeid erinevaid üksiku nukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed pandi kokku amplikonipõhiselt (tabel 17), et määrata genoomse sisu mõju õigete nimetuste protsendile. Õigete nimetuste osakaal sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on alla 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvaid nimetusi.

tabel 17 Mooduliga Somatic saadud andmete täpsus amplikoni tasemel

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Polü A (5), Polü C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Polü G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Polü T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Polü A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Ei kohaldu	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Polü A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Polü T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Polü T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Polü T (5), Polü A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Ei kohaldu	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Polü T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ei kohaldu	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Polü A (5), Polü T (5), Polü A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Polü A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Polü G (6), Polü T (5), Polü A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Ei kohaldu	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Polü A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Polü A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Polü A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Ei kohaldu	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	Ei kohaldu	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Polü A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Polü T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Polü G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Polü T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Polü C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Polü G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Polü A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Ei kohaldu	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Polü A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Polü G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
48	7	149503875	149503965	91	91	Polü G (6), Polü C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Ei kohaldu	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Ei kohaldu	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Polü G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Polü G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Ei kohaldu	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Polü C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Polü G (5), indel	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Polü T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Polü A (5), Polü T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Ei kohaldu	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Ei kohaldu	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Ei kohaldu	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Ei kohaldu	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Ei kohaldu	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Polü A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Ei kohaldu	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Polü G (6)	0,55	34047	0	369	98,9

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Polü A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Polü C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Polü A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Ei kohaldu	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Polü A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Polü G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Ei kohaldu	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Polü A (5), Polü T (7), Polü A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Ei kohaldu	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Polü T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Polü A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Polü C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Polü G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Polü T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Ei kohaldu	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Ei kohaldu	0,27	23809	0	5	>99,9

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
102	16	28997904	28997998	95	95	Polü C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Polü C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Polü T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Polü C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Polü T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Polü A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Polü A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Polü A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Polü T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Ei kohaldu	0,37	34386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Polü A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Polü A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Ei kohaldu	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Ei kohaldu	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Ei kohaldu	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Ei kohaldu	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Ei kohaldu	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9

Amplikon	Kromosoom	Amplikoni algus	Amplikoni lõpp	Analüüsitud fragmendi suurus	Usalduspiirkondade alused	Amplikoni genoomne sisu	GC sisaldus	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Polü G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Polü T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Polü A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Polü T (5), Polü A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Ei kohaldu	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Ei kohaldu	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Polü T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Polü C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Ei kohaldu	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ei kohaldu	0,55	0	0	0	Ei kohaldata
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ei kohaldu	0,48	0	0	0	Ei kohaldata
150	Y	2655609	2655679	71	0	Polü A (5)	0,37	0	0	0	Ei kohaldata

Proovi GM12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (NIST) (v.2.19). 150 amplikonist 92 sisaldasid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 41 amplikonil oli osaline kattuvus ja 17 amplikonil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 10 000 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on toodud tabel 18.

tabel 18 Proovi GM12878 mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus NIST andmebaasiga

Proov	Amplikonide arv	Keskmine nimetuse määr	TP	VN	TN	VP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Selle üheksa käitusega mooduli Somatic uuringu andmete põhjal saab seadmega Seade NextSeq 550Dx järjekindlalt sekveneerida järgmist:

- GC sisaldus  $\geq 19\%$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 19% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 2,6%)
- GC sisaldus  $\leq 87\%$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 87% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,6%)
- PolüA pikkused  $\leq 9$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 9-nukleotiidset PolüA kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 2,5%)
- PolüT pikkused  $\leq 10$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 10-nukleotiidset PolüT kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli väiksem kui 0,1%)
- PolüG pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 2268 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüG kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,5%)
- PolüC pikkused  $\leq 6$  (kõik nimetatud alused 756 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 6-nukleotiidset PolüC kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,4%)
- Dinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 4x$  (kõik nimetatud alused 1890 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 4x dinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,9%)
- Trinukleotiidi korduse pikkused  $\leq 5x$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 5x trinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,4%)
- Insertiooni pikkused  $\leq 23$  (kõik nimetatud alused 378 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 23-nukleotiidset insertiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,8%)
- Deletsiooni pikkused  $\leq 25$  (kõik nimetatud alused 1134 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 25-nukleotiidset deletsiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,7%)

## Kordustäpsus

Seade NextSeq 550Dx kordustäpsus määrati analüüsid 13 kordumatut Platinum Genome'i proovi, kasutades selleks kolme seadet, kolme reaktiivikomplekti ja kolme operaatorit, et teha viie päeva jooksul üheksa sekveneerimiskäitust. Näitlik analüüs, proovid ja referentsmeetod on samad kui need, mida on kirjeldatud idutee

täpsusuuringu jaoks. Kordustäpsuse panused määrati varieeruvuskomponendi analüüsiga, kasutades VAF-i vastuse muutujana ja arvutades standardhälbed komponendi tasemel seadme, reaktiivipartii, operaatori ja päeva kohta (tabel 19). Seadme, operaatori või reaktiivikomplekti varieeruvuse iga komponendi kohta analüüsis kasutatavate vaatluste koguarv oli SNV-de, insertioonide ja deletsioonide korral vastavalt 699, 176 ja 235.

tabel 19 Kordustäpsuse tulemused seadme NextSeq 550Dx kohta (standardhälve)

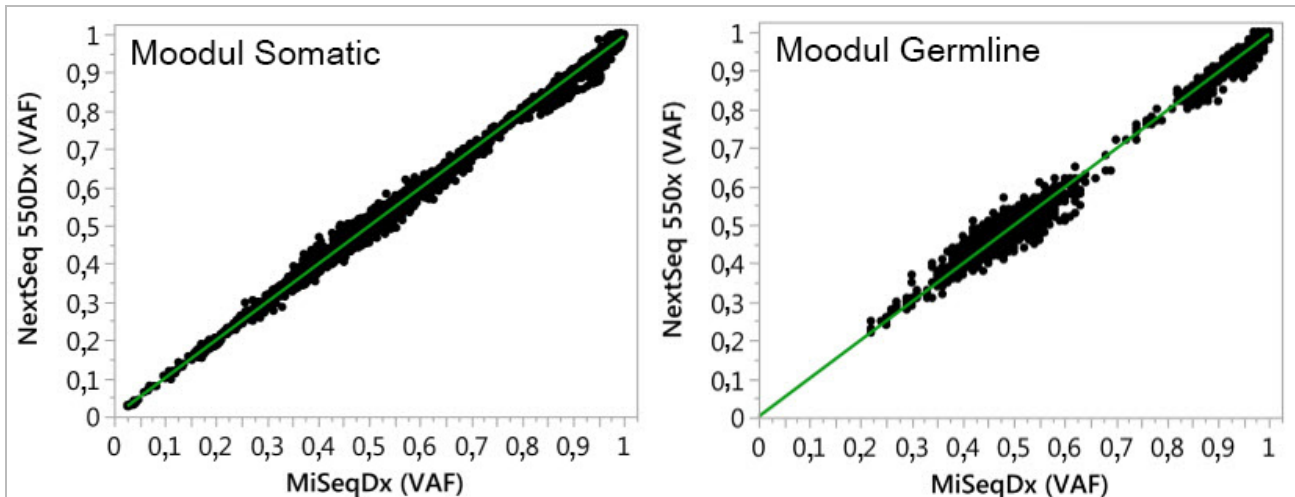
Komponent	Variandi tüüp	Komponendi SD		SD kokku	
		Max	Mediaan	Max	Mediaan
Partii	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertsioon	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deletsioon	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Seade	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertsioon	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deletsioon	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operaator	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertsioon	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deletsioon	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Päev	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertsioon	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deletsioon	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

## Meetodi võrdlus (sekveneerimisplatvorm)

Täisvere- ja FFPE-proove hinnati seadmetes Seade NextSeq 550Dx ja MiSeqDx kasutades komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx idutee ja somaatilist töövoogu. Vere- ja FFPE-proovide variandi sageduse ühtivust hinnati mitme näitliku analüüsiga. [joonis 2](#) kujutab VAF-i korrelatsiooni kahe seadme vahel ühe näitliku analüüsi kohta ja [tabel 20](#) on see korrelatsioon kokku võetud analüüsipaneeli järgi. MiSeqDx seadme ja Seade NextSeq 550Dx vahelise tugeva korrelatsiooni põhjal määratakse, et eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajad (nt eraldamismeetodid või segavad ained) kehtivad mõlemale seadmele. Lisateavet vaadake seadme komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx pakendi teabelehest.



joonis 2 MiSeqDx ja NextSeq 550Dx seadmete vaheline VAF-i korrelatsioon FFPE- (vasakul) ja vereproovide (paremal) korral, kasutades analüüsi 1



tabel 20 Meetodi võrdluse tulemused, kasutades kordumatuid vere- ja FFPE proove

gDNA allikas	Analüüs (oligokogum)	Bioloogilised replikaadid (proovid)	Tehnilised replikaadid (proovi kohta)	Vaatlused (variantide arv)	Kalle	Lõikepunkt	Korrelatsioon (R <sup>2</sup> )
Veri	Analüüs 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Veri	Analüüs 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analüüs 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Analüüs 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup> Kaks andmepunkti eemaldati mooduli Germline Variant Module jaoks kehtestatud piirangu põhjal.

<sup>2</sup> VAF-i diagrammide määramiskoeffitsient joonisel 2 näidatud kujul.

## Korratavus

Seade NextSeq 550Dx korratavust hinnati Platinum Genome'i proovidega kasutades representatiivset analüüsi, mis on mõeldud mitmesuguste geenide uurimiseks 12 588 bp ulatuses 23 eri kromosoomis, kasutades 150 ampliconi. Idutee analüüs sisaldas 13 proovi seitset replikaati; somaatiline analüüs sisaldas seitsme proovi kuut replikaati VAF-i eri tasemetel. Proovide valmistamiseks kasutati komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Analüüs tehti kolmes välises keskuses, kasutades üht reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) partiid. Igas kohas kasutati üht seadet NextSeq 550Dx. Igas kohas viisid analüüsi läbi kaks operaatorit. Iga operaator tegi analüüsi kolmel mittejärjestikusel päeval iga proovi tüübiga, kolmes kohas kokku 36 käitust. Analüüs andis tulemuseks 18 käitust iga idutee ja somaatilise töövoogi käituse kohta.

## Moodul Germline

Germline variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$ , esitatakse positiivsetena (variant). Eeldatavate positiivsete iduliinivariantide puhul hinnati andmeid nimetamatus määra ja positiivsete nimetamiste protsendi kohta igas varianti tüübis (SNV, insertioon, deletsioon). tabel 21 on kokku võetud vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 21 Eeldatavate positiivsete tulemuste iduliini nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi

Variandi tüüp	Puuduv nimetus			Õige positiivne nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	Vaadeldud	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110,376	0,014	110,349	110,360	99,99	99,98	99,99
Insertsioonid	1026	37,044	2,77	36,018	36,018	100	99,99	100,00
Deletsioonid	648	34,776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Germline variandid, mille VAF-tase on  $< 0,2$ , esitatakse negatiivsetena (metsiktüüp). Eeldatavate negatiivsete somaatiliste asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumise määra ja õigete metsiktüüpi nimetuste määra suhtes. tabel 22 on kokku võetud vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 22 Eeldatavate negatiivsete tulemuste iduliini signaalide vaatlused

Variandi tüüp	Puuduv nimetus			Õige negatiivne nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	Vaadeldud	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
Metsiktüüpi	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Germline variante, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks heterosügootseks ja variante, mille VAF-tase on  $\geq 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks homosügootseks. Heterosügootsete variantidega proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust. Cx määrati mõlema piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli Cx  $\geq 99,999\%$ , mis näitab, et  $\geq 99,999\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF korral oli Cx  $\leq 0,001\%$ , mis näitab, et  $\leq 0,001\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. tabel 23 on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi.

Germline variante, mille VAF-tase on  $\geq 0,2$  ja  $< 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks heterosügootseks ja variante, mille VAF-tase on  $\geq 0,7$ , nimetatakse variandi suhtes positiivseks homosügootseks. Heterosügootsete variantidega proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust. Cx määrati mõlema piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli Cx  $\geq 99,999\%$ , mis näitab, et  $\geq 99,999\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF suhtes oli Cx  $\leq 0,001\%$ , mis näitab, et  $\leq 0,001\%$  heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. tabel 23 on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi.

tabel 23 Heterosügootsete variantide Germline Cx-i väärtused

Variandi tüüp	Piirväärtus 0,2 VAF	Piirväärtus 0,7 VAF
	≥ C99,999%	≤ C0,001%
SNV	94/94	94/94
Insertsioonid	24/24	24/24
Deletsioonid	35/35	35/35
Kokku	153	153

## Moodul Somatic

Somaatilised variandid, mille VAF-tase on  $\geq 0,026$ , esitatakse positiivsetena (variant). Vaatlused, mille VAF-tase oli  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ , peeti selle analüüsi suhtes ebamäärasteks (ei ole positiivsed ega negatiivsed, märgitud madala sagedusega variantiks). Toimivuse hindamiseks arvutati tulemused kolmel viisil:

- Parim juhtum: Parim olukord: kõik ebamäärased tulemused loeti õigeks positiivseks nimetuseks (ühtivus eeldatavate tulemustega)
- Halvim juhtum: Halvim olukord: kõik ebamäärased tulemused loeti valeks nimetuseks (vastuolu eeldatavate tulemustega)
- Väljajätmise juhtum: kõik ebamäärased tulemused välistati analüüsist

Kolmes tabelis, tabel 24, tabel 25 ja tabel 26, on kokku võetud nimetuste tulemused vastavalt parima olukorra, halvima olukorra ja välistamise kohta koos Wilsoni skoori meetodiga arvatud alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL).

tabel 24 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (parim olukord)

Variandi tüüp	Õige positiivne nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertsioonid	18036	18036	100	99,98	100,00
Deletsioonid	18 381	18 381	100	99,98	100,00

tabel 25 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (halvim olukord)

Variandi tüüp	Õige positiivne nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertsioonid	18000	18036	99,8	99,72	99,86
Deletsioonid	18 381	18 381	100	99,98	100,00

tabel 26 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (ebamäärased nimetused on eemaldatud)

Variandi tüüp	Õige positiivne nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertsioonid	18000	18000	100	99,98	100,00
Deletsioonid	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somaatilised variandid, mille VAF-tase on  $< 0,01$ , esitatakse negatiivsetena (metsiktüüp). Eeldatavate negatiivsete somaatiliste asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumise määra ja õigete metsiktüüpi nimetuste määra suhtes. Õiged metsiktüüpi nimetused määrati, välistades nimetuse puudumised ja arvates maha vaadeldud nimetused, mis jäid ebamäärasesse tsooni (VAF-tasemed  $\geq 0,01$  ja  $< 0,026$ ), ning valed nimetused, mis jäid koguväärtuse piirväärtusest kõrgemale (VAF-tasemed  $\geq 0,026$ ). tabel 27 on kokku võetud vaadeldud tulemused, kogutulemused ja protsendid negatiivsete somaatiliste asukohtade nimetuste puudumise määra kohta ja õigete metsiktüüpi nimetuste määra kohta koos ülemise ja alumise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodiga.

tabel 27 Eeldatavate negatiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused

Variant Tüüp	Puuduv nimetus					Õige nimetus				
	Vaadeldud	Kokku	Protsent	Ebamäärane	Vale	Õige	Kokku	Protsent	95% LCL	95% UCL
Metsiktüüpi	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Analüüsi C95 määramiseks arvutati sama variandi kohta somaatilised proovid VAF-i eri tasemetel (iga variandi tüübi sees). Varieeruvuse hindamiseks analüüsi piirväärtuse lähedal kasutati proove, mille eeldatav VAF-tase oli vahemikus 0,02 kuni 0,07. C95 määrati iga variandi kohta, iga variandi tüübi kõrgeim C95 on toodud tabel 28.

tabel 28 Mooduliga Somatic saadud andmete C95 kokkuvõte

Variandi tüüp	Arv	C95
SNV	74	0,0613
Insertsioon	24	0,0573
Deletsioon	33	0,0575

# Reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) toimivus

## Ülevaade

NextSeq 550Dx saab kasutada kahe reaktiivikomplektiga: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Selleks et näidata, et reaktiivikomplekt NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) vastab reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) jaoks kontrollitud ja kinnitatud analüüsi tehnilistele nõudmistele, viidi läbi uuringud reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Tehti kaks teegi ettevalmistust, kasutades komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, üks idutee mooduli ja teine somaatilise mooduli töövooga. Mõlema töövoote analüüsiti kolme reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) partiiga kolmel seadmel NextSeq 550Dx. Lisaks sisaldas mõlema töövoote analüüs üht käitust reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli).

## Analüütiline tundlikkus (kriitiline väärtus (LoB) ja avastamispiir (LoD))

Kontroll reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) näitas, et seade Seade NextSeq 550Dx suudab tuvastada variante väärtuse 0,05 VAF juures II tüüpi veaga  $\leq 0,05$ , ja et Somatic Variant Module mooduliga kasutatav piirväärtus 0,026 VAF (tegelik LoB) toetab I tüüpi viga  $\leq 0,01$ . Nende väidete põhjal võib eeldada, et variant tasemel 0,05 VAF on suurem kui 0,026 VAF või sellega võrdne 95%-l ajast ja et metsiktüüpi positsioon on väiksem kui 0,026 VAF 99%-l ajast. Tagamaks, et need väited saavad kinnitust ka reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli), viidi seadmega NextSeq 550Dx läbi kordusmõõtmised metsiktüüpi proovidega (LoB proovid) ja proovidega, mis sisaldasid variante tasemel 0,05 VAF (LoD proovid), kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Seejärel võrreldi piirväärtusest 0,026 üleval- ja allpool olevate nimetuste osakaalu väidetega, mis saadi reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli).

Analüüs sisaldas kaht LoD proovi, kummalgi kordumatu variantide komplekt sihiga väärtusele 0,05 VAF, ja vastavaid LoB proove, mis olid sihtvariantide suhtes metsiktüüpi. Teegi ettevalmistamiseks töödeldi LoD ja LoB proove vastavalt kaheksa ja seitsme replikaadi kaupa, kasutades komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Teeke sekveneeriti algselt reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli), et tuvastada variandid/genoomikoordinaadid LoB/LoD hindamiseks reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Kõiki variante, mille keskmine VAF oli reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) tulemuste põhjal vahemikus 0,045–0,055 (LoD variandid), kasutati LoD analüüsiks (N = 51 varianti). LoB analüüsiks hinnati 51 vastavat genoomikoordinaati.

Reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) hindamiseks sekveneeriti teede kolmes käituses kolmel järjestikusel päeval, kasutades sama seadet ja reaktiivikomplekti partiid. See analüüsimine andis kokku 24 replikaati igale 51 LoD variandile ja 21 replikaati igale vastavale metsiktüüpi positsioonile. Väärtusega VAF < 0,026 metsiktüüpi nimetuste osakaal on toodud [tabel 29](#). VAF-iga 0,026 või sellest suurema väärtusega LoD variandi nimetuste osakaal on toodud [tabel 30](#).

tabel 29 Väärtusega &lt; 0,026 metsiktüüpi positsioonide osakaal (LoB väite hindamine)

Variant Tüüp	Hinnatud positsioonid	Vaatlusi kokku	VAF mõõtmiste arv ≥ 2,6%	Osakaal < 2,6%	Osakaal 95% Usaldusvahemik
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Insertsioon	11	231	0	1	0,984–1
Deletsioon	8	168	0	1	0,978–1

tabel 30 Väärtusega ≥ 0,026 VAF LoD variantide osakaal (LoD väite hindamine)

Variant Tüüp	Hinnatud positsioonid	Vaatlusi kokku	VAF mõõtmiste arv v < 2,6%	VAF mõõtmiste arv v ≥ 2,6%	Osakaal ≥ 2,6%	Osakaal 95% Usaldusvahemik
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Insertsioon	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Deletsioon	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

## Täpsus

### Moodul Germline

Järgmine uuring viidi läbi, et hinnata variandi nimetuse täpsust mooduliga Germline Variant Module, kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 (300 tsükli). Representatiivset analüüsi kasutades analüüsiti 12 kordumatut Platinum Genome'i proovi. Kokku tehti 11 käitust kolme seadmega NextSeq 550Dx ja kolme reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli).

Täpsus määrati SNV-de, insertsioonide ja deletsioonide kohta, selleks võrreldi tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Viiteks on toodud reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ühe sekveneerimiskäitusega saadud tulemused. Tulemuste kokkuvõte on toodud [tabel 31](#).

tabel 31 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Vaatlusi kokku (v2.5) <sup>1</sup>	Tulemus vaatluse järgi (v2.5) <sup>2</sup>	Tulemus vaatluse järgi (v2) <sup>3</sup>	Tulemus käituse järgi (v2.5) <sup>4</sup>	Tulemus käituse järgi (v2) <sup>4</sup>
SNV PPA	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
Insertsioonide PPA	1056	100	100	100	100
Deletsioonide PPA	1056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta × käituste arv (96 proovi käituse kohta × 11 käitust = 1056 vaatlust).

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõikides käitustes (11 käituse põhjal reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta ühes käituses (kokku 96 vaatlust).

<sup>4</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

## Moodul Somatic

Järgmine uuring viidi läbi mooduli Somatic Variant Module variandi nimetamise täpsuse hindamiseks seadmes NextSeq 550Dx, kasutades reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli). Representatiivse analüüsiga analüüsiti kümme Platinum Genome'i FFPE-proovi (kaks väärtusele 0,05 VAF lahjendatud variantidega). Kokku tehti 11 käitust kolme seadmega NextSeq 550Dx ja kolme reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) partiiga.

Täpsus määrati SNV-de, insertioonide ja deletsioonide kohta, selleks võrreldi tulemusi hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga, Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Viiteks on toodud reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ühe sekveneerimiskäitusega saadud tulemused. Tulemuste kokkuvõte on toodud tabel 32.

tabel 32 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Vaatlusi kokku (v2.5) <sup>1</sup>	Tulemus vaatluse järgi (v2.5) <sup>2</sup>	Tulemus vaatluse järgi (v2) <sup>3</sup>	Tulemus käituse järgi (v2.5) <sup>4</sup>	Tulemus käituse järgi (v2) <sup>4</sup>
SNV PPA	528	100	100	100	100
Insertioonide PPA	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9
Deletsioonide PPA	528	100	100	100	100
NPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
OPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Arvutatud proovide arvuna käituse kohta × käituste arv (48 proovi käituse kohta × 11 käitust = 528 vaatlust).

<sup>2</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõikides käitustes (11 käituse põhjal reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup> Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta ühes käituses (kokku 96 vaatlust).

<sup>4</sup> Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

## Kordustäpsus

### Moodul Germline

Reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) kordustäpsust mooduliga Germline Variant Module hinnati kasutades Platinum Genome'i proove ja representatiivset analüüsi. Analüüsimine koosnes ühest teegi ettevalmistusest, kasutades komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, ja



sisaldas 12 proovi, mida kõiki töödeldi kaheksa replikaadiga. Teeke sekveneeriti reaktiivikomplektiga NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit) ja kolme seadmega NextSeq 550Dx, kokku üheksa sekveneerimiskäitust.

Heterosügootsete variantidega proove kasutati määramaks, kas analüüsile omane varieeruvus mõjutab genotüübi nimetust (N = 153 kordumatut heterosügootset varianti). Cx määrati mõlema mooduli Germline Variant Module piirväärtuse kohta (0,2 heterosügootsete ja 0,7 homosügootsete genotüüpide korral), kus x on piirväärtust ületavate korduvate testide osakaal. Alumise piirväärtuse 0,2 VAF korral oli reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit) minimaalse Cx-iga variandi tulemus > 99,9%, mis näitab, et > 99,9% heterosügootsetest variantidest nimetatakse heterosügootseteks. Ülemise piirväärtuse 0,7 VAF korral oli reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit) maksimaalse Cx-iga variandi tulemus < 1,5%, mis näitab, et ≤ 1,5% heterosügootsetest variantidest nimetatakse homosügootseteks. tabel 33 on tulemused kokku võetud variandi tüübi järgi. Viiteks on toodud reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsüklit) ühe sekveneerimiskäitusega saadud Cx-i väärtused.

tabel 33 Heterosügootsete variantide Germline Cx-i väärtused

Variandi tüüp	Arv	Piirväärtus 0,2 VAF		Piirväärtus 0,7 VAF	
		Min Cx (v2,5) <sup>1</sup>	Min Cx (v2) <sup>2</sup>	Max Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Max Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	>99,9	>99,9	1,5%	1,0%
Insertsioonid	24	100%	100%	0%	<0,1%
Deletsioonid	35	100%	>99,9	<0,1%	<0,1%

<sup>1</sup> Cx-i väärtused standardhälbe koguhinnangute põhjal varieeruvuskomponendi analüüsist.

<sup>2</sup> Cx-i väärtused näidisstandardhälvete põhjal.

## Moodul Somatic

Reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit) kordustäpsust mooduliga Somatic Variant Module hinnati kasutades Platinum Genome'i FFPE-proove ja representatiivset analüüsi. Analüüsimine koosnes ühest teegi ettevalmistusest, kasutades komplekti TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, ja sisaldas kaht proovi kaheksa replikaadiga. Teeke sekveneeriti reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit) kolme partiiga ja kolme seadmega NextSeq 550Dx, kokku üheksa sekveneerimiskäitust.

Eeldatavate VAF-i tasemetega ≤ 0,10 VAF somaatilisi variante (N = 131 kordumatut varianti) kasutati seadme varieeruvuse hindamiseks mooduli Somatic Variant Module VAF-i piirväärtuse lähedal (somaatilisi variante VAF-i tasemega ≥ 0,026 nimetatakse variandi suhtes positiivseteks). C95 väärtused määrati iga somaatilise variandi kohta. C95 väärtused esindavad VAF-i, mille korral on 95% tõenäosus, et see on suurem kui mooduli Somatic Variant Module VAF-i piirväärtus. Kõrgeimad C95 väärtused variandi tüübi järgi on toodud tabel 34. Viiteks on toodud reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsüklit) ühe sekveneerimiskäitusega saadud C95 tulemused.



tabel 34 Mooduliga Somatic saadud andmete C95 kokkuvõte

Variandi tüüp	Hinnatud variantide arv	C95 (v2,5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Insertsioonid	24	0,062	0,061
Deletsioonid	33	0,060	0,060

<sup>1</sup> C95 väärtused standardhälbe koguhinnangute põhjal varieeruvuskomponendi analüüsist.

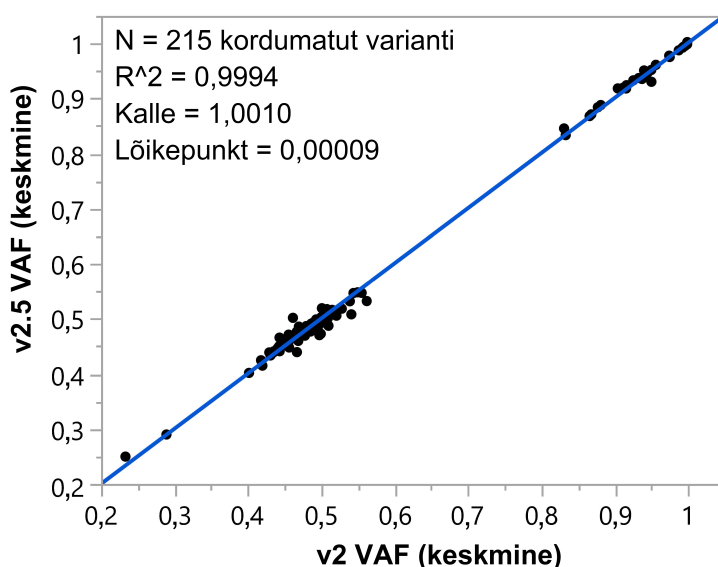
<sup>2</sup> C95 väärtused näidisstandardhälvete põhjal.

## Meetodi võrdlus (reaktiivikomplekt)

### Moodul Germline

215 kordumatu variandi keskmisi VAF-väärtusi hinnati reaktiivikomplektidega NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli), kasutades mooduliga Germline Variant Module saadud tulemusi. VAF-i keskmised arvutati 11 sekveneerimiskäitusest (v2.5) ja ühest sekveneerimiskäitusest (v2). Iga variandi keskmise arvutamiseks kasutati vähemalt kaheksat replikaati. [joonis 3](#) on kujutatud VAF-i korrelatsioon kahe reaktiivikomplekti vahel. Tugeva lineaarse VAF-i korrelatsiooni ja reaktiivikomplektide tulemuste sarnasuse põhjal määratakse, et reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja mooduliga Germline Variant Module algselt kontrollitud ja kinnitatud toimivusnäitajad on rakendatavad reaktiivikomplektile NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli).

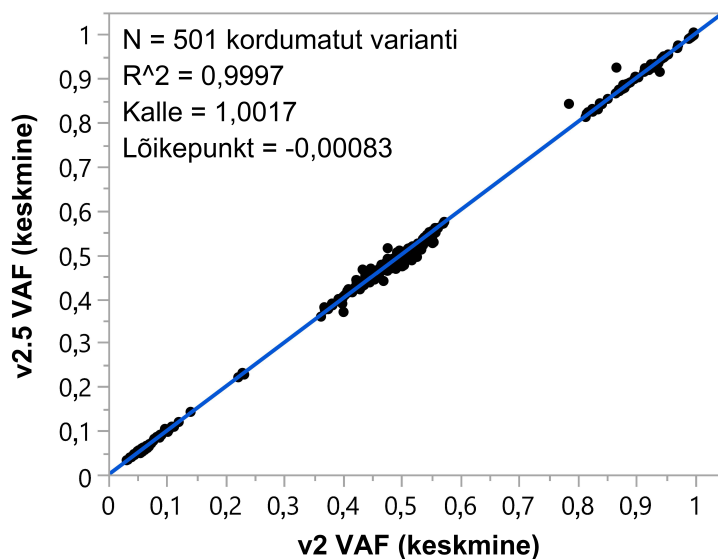
joonis 3 Mooduli Germline Variant Module variantalleeli sageduse (VAF) korrelatsioon reaktiivikomplekti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) vahel.



## Moodul Somatic

501 kordumatu variandi keskmisi VAF-väärtusi hinnati reaktiivikomplektidega NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli), kasutades mooduliga Somatic Variant Module saadud tulemusi. VAF-i keskmised arvutati 11 sekveneerimiskäitusest (v2.5) ja ühest sekveneerimiskäitusest (v2). Iga kordumatu variandi keskmise arvutamiseks kasutati vähemalt kolme replikaati. [joonis 4](#) on kujutatud VAF-i korrelatsioon kahe reaktiivikomplekti vahel. VAF-i korrelatsiooni ja reaktiivikomplektide tulemuste sarnasuse põhjal määratakse, et seadme NextSeq 550Dx reaktiivikomplektiga High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) mooduliga Somatic Variant Module kontrollitud ja kinnitatud toimivusnäitajad on rakendatavad seadme NextSeq 550Dx reaktiivikomplektile High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli).

joonis 4 Mooduli Somatic Variant Module variantalleeli sageduse (VAF) korrelatsioon reaktiivikomplektide NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) ja NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) vahel.



## Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200031448 v00	Juuni 2023	<p>Esialgne väljalase.</p> <p>Eelmine dokument 1000000030326 asendati selle dokumendiga. Muudatused dokumendist 1000000030326 v6 selle uue dokumendi osas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Lisatud on sisu, mis toetab valikulist Illumina DRAGEN Serverit seadme NextSeq 550Dx jaoks.</li> <li>Uuendatud õhufiltri osa number.</li> </ul> <p>Dokumendis 1000000030326 tehtud muudatused:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Allikatarkvarast tahtmatult lisatud sisu parandamiseks tehtud värskendused.</li> <li>Hoiatuste ja ettevaatusabinõude jaotisse lisati lause ohujuhtumitest teatamise kohta.</li> <li>Lisati protseduuripõhimõtetele avaldus, milles täpsustatakse kavandatud kasutajat.</li> <li>Lisatud reaktiivikomplekti High Output Reagent Kit v2 (300 tsükli) viide.</li> <li>Lisatud reaktiivikomplekti High Output Reagent Kit v2.5 (75 tsükli) viide.</li> <li>Lisatud muudatuste ajaloo tabel. Uuendati ELi volitatud esindaja aadressi.</li> </ul>

## Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSİKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2023 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktteave



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Sponsor Austraalias

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

## Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiате, kui külastate aadressi [support.illumina.com](http://support.illumina.com) ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumentatsioon).