

Όργανο NextSeq™ 550Dx

ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ IN VITRO
ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ

Αρ. καταλόγου 20005715

Προβλεπόμενη χρήση

Το όργανο NextSeq 550Dx προορίζεται για την αλληλούχιση βιβλιοθηκών DNA όταν χρησιμοποιείται με *in vitro* διαγνωστικούς προσδιορισμούς. Το όργανο NextSeq 550Dx προορίζεται για χρήση με συγκεκριμένα, πιστοποιημένα ή εγκεκριμένα *in vitro* διαγνωστικά εργαστήρια και λογισμικό ανάλυσης.

Αρχές της διαδικασίας

Το όργανο Illumina NextSeq 550Dx προορίζεται για την αλληλούχιση βιβλιοθηκών DNA με *in vitro* διαγνωστικούς προσδιορισμούς και πρέπει να χρησιμοποιείται από ειδικευμένο και καταρτισμένο προσωπικό που έχει εκπαιδευτεί στη χρήση *in vitro* διαγνωστικών διαδικασιών που εκτελούνται σε κλινικό εργαστήριο. Ως στοιχείο εισόδου, το NextSeq 550Dx χρησιμοποιεί βιβλιοθήκες οι οποίες έχουν δημιουργηθεί από DNA όπου ευρετήρια δειγμάτων και αλληλουχίες λήψης προστίθενται σε ενισχυμένους στόχους. Οι βιβλιοθήκες δειγμάτων λαμβάνονται σε μια κυψελίδα ροής και υποβάλλονται σε αλληλούχιση στο όργανο με τη μέθοδο της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (SBS). Η χημική μέθοδος SBS χρησιμοποιεί μια μέθοδο αναστρέψιμου τερματιστή για την ανίχνευση φθορισμοεπισημασμένων μεμονωμένων νουκλεοτιδικών βάσεων καθώς αυτές ενσωματώνονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες DNA. Το λογισμικό Real-Time Analysis (RTA) εκτελεί ανάλυση εικόνων και αντιστοίχιση βάσης και εκχωρεί μια βαθμολογία ποιότητας σε κάθε βάση για κάθε κύκλο αλληλούχισης. Όταν ολοκληρωθεί η κύρια ανάλυση, μπορεί να εκτελεστεί δευτερεύουσα ανάλυση στο όργανο για την επεξεργασία των αντιστοιχίσεων βάσης. Ανάλογα με τη ροή εργασιών, το NextSeq 550Dx χρησιμοποιεί διαφορετικές μονάδες δευτερεύουσας ανάλυσης. Για τη μονάδα Germline Variant Module ή Somatic Variant Module, η επεξεργασία περιλαμβάνει αποπολύπλευση, δημιουργία αρχείων FASTQ, ευθυγράμμιση, αντιστοίχιση παραλλαγών και δημιουργία αρχείων αντιστοίχισης βάσης (σε μορφή VCF και gVCF). Τα αρχεία VCF και gVCF περιέχουν πληροφορίες για παραλλαγές που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα γονιδίωμα αναφοράς.

Διαμόρφωση διπλής εκκίνησης

Το όργανο NextSeq 550Dx διαθέτει μια διαμόρφωση διπλής εκκίνησης για να είναι εφικτή η χρήση του οργάνου μόνο σε διαγνωστική (Dx) ή σε ερευνητική λειτουργία (RUO). Στη διαγνωστική λειτουργία εκτελούνται *in vitro* διαγνωστικοί προσδιορισμοί, συμπεριλαμβανομένων των μονάδων Germline Variant Module και Somatic Variant Module. Στη διαγνωστική λειτουργία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο αντιδραστήρια αλληλούχισης IVD. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης και οι περιορισμοί της διαδικασίας για το όργανο NextSeq 550Dx καθορίστηκαν για τις μονάδες Germline Variant Module και Somatic Variant Module σε διαγνωστική λειτουργία.

Περιορισμοί της διαδικασίας

- 1 Για χρήση στη διάγνωση *in vitro*.
- 2 Οι μονάδες Germline Variant Module και Somatic Variant Module, όταν χρησιμοποιούνται με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) ή με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων), μπορούν να παράσχουν τα εξής:
 - ▶ Δεδομένα εξόδου αλληλούχισης ≥ 90 gigabases (Gb)
 - ▶ Μήκος ανάγνωσης (σε εκτέλεση συζευγμένων άκρων) 2 x 150 ζεύγη βάσεων (bp)

- ▶ Βάσεις ίσες με ή μεγαλύτερες από Q30 $\geq 75\%$ σε μήκος ανάγνωσης 2 x 150 bp
Οι βάσεις που είναι ίσες με ή μεγαλύτερες από 75% έχουν βαθμολογίες ποιότητας Phred ≥ 30 , γεγονός που υποδεικνύει ακρίβεια αντιστοίχισης βάσης μεγαλύτερη από 99,9%
- 3 Οι αναγνώσεις με indel (προσθήκες, διαγραφές ή συνδυασμούς) όπου το μήκος περιεχομένου είναι > 25 bp δεν ευθυγραμμίζονται από το λογισμικό του προσδιορισμού. Επομένως, τα indel με μήκος > 25 bp δεν είναι ανιχνεύσιμα από το λογισμικό του προσδιορισμού.
- 4 Το λογισμικό του προσδιορισμού ενδέχεται να μην ευθυγραμμίζει τις αναγνώσεις των αμπλικονίων με ακραίο περιεχόμενο, με αποτέλεσμα η περιοχή να αναφέρεται ως άγριου τύπου. Τέτοιο ακραίο περιεχόμενο περιλαμβάνει:
 - ▶ Αναγνώσεις που περιέχουν περισσότερα από τρία indel
 - ▶ Αναγνώσεις μήκους τουλάχιστον 30 bp με περιεχόμενο μονής νουκλεοτιδικής παραλλαγής (SNV) > 4% του συνολικού στοχευόμενου μήκους αμπλικονίων (εξαιρουμένων των περιοχών των ανιχνευτών)
 - ▶ Αναγνώσεις μήκους < 30 bp με περιεχόμενο SNV > 10% του συνολικού μήκους αμπλικονίων (συμπεριλαμβανομένων των περιοχών των ανιχνευτών)
- 5 Οι μεγάλες παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των πολυνουκλεοτιδικών παραλλαγών (MNV) και των μεγάλων indel, ενδέχεται να αναφερθούν ως χωριστές μικρότερες παραλλαγές στο αρχείο εξόδου VCF.
- 6 Οι παραλλαγές διαγραφής μπορούν να φιλτραριστούν ή να χαθούν όταν περιλαμβάνουν δύο παρακείμενα αμπλικόνια, εάν το μήκος της διαγραφής είναι μεγαλύτερο ή ίσο με την επικάλυψη μεταξύ των παρακείμενων αμπλικονίων.
- 7 Το σύστημα δεν μπορεί να ανιχνεύσει indel εάν εμφανιστούν απευθείας δίπλα σε έναν εκκινητή και δεν υπάρχει επικαλυπτόμενο αμπλικόνιο. Για περιοχές με επικαλυπτόμενα αμπλικόνια, ο προσδιορισμός δεν μπορεί να ανιχνεύσει διαγραφές όταν η περιοχή της επικάλυψης είναι μικρότερη από το μέγεθος της διαγραφής που πρέπει να ανιχνευθεί. Για παράδειγμα, εάν η περιοχή της επικάλυψης μεταξύ δύο παρακείμενων αμπλικονίων είναι δύο βάσεις, ο προσδιορισμός δεν μπορεί να ανιχνεύσει διαγραφές που περιλαμβάνουν και τις δύο αυτές βάσεις. Μπορεί να ανιχνευθεί διαγραφή μίας βάσης σε οποιαδήποτε από αυτές τις δύο βάσεις.
- 8 Όπως με κάθε ροή εργασίας προετοιμασίας βιβλιοθήκης με βάση την υβριδοποίηση, οι υποκείμενοι πολυμορφισμοί, μεταλλάξεις, εισαγωγές ή διαγραφές σε περιοχές δέσμευσης ολιγονουκλεοτιδίων μπορούν να επηρεάσουν τα αλληλόμορφα που ανιχνεύονται και τις αντιστοιχίσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης. Για παράδειγμα:
 - ▶ Μια παραλλαγή που συνάδει με μια παραλλαγή στην περιοχή εκκινητή ενδέχεται να μην ενισχυθεί. Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ψευδώς αρνητικό.
 - ▶ Οι παραλλαγές στην περιοχή εκκινητή θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ενίσχυση του αλληλόμορφου αναφοράς, με αποτέλεσμα η αντιστοίχιση της ομόζυγης παραλλαγής να είναι εσφαλμένη.
 - ▶ Οι παραλλαγές του indel στην περιοχή εκκινητή μπορούν να προκαλέσουν μια ψευδώς θετική αντιστοίχιση στο τέλος της ανάγνωσης δίπλα στον εκκινητή.
- 9 Τα indel μπορούν να φιλτραριστούν λόγω μεροληψίας αλυσίδας, εάν εμφανιστούν κοντά στο τέλος μίας ανάγνωσης και συνδεθούν χαλαρά κατά τη διάρκεια της ευθυγράμμισης.
- 10 Οι μικρές MNV δεν έχουν επικυρωθεί και αναφέρονται μόνο στη μονάδα Somatic Variant Module.
- 11 Οι διαγραφές αναφέρονται στο VCF, στη συντεταγμένη της βάσης που προηγείται ανά μορφή VCF. Επομένως, πρέπει να λαμβάνετε υπόψη τις παρακείμενες παραλλαγές προτού αναφέρετε μια μεμονωμένη αντιστοίχιση βάσης ως ομόζυγη αναφορά.
- 12 Ειδικό περιορισμό για την αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς:
 - ▶ Το όργανο NextSeq 550Dx, το οποίο χρησιμοποιεί τη μονάδα Local Run Manager Germline Variant Module για το NextSeq 550Dx, έχει σχεδιαστεί για την παροχή ποιοτικών αποτελεσμάτων για την αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς (π.χ. ομόζυγη, ετερόζυγη, άγριου τύπου).
 - ▶ Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μονάδα Germline Variant Module, η ελάχιστη κάλυψη ανά αμπλικόνιο που χρειάζεται για την ακριβή αντιστοίχιση των παραλλαγών είναι 150x. Κατά συνέπεια, απαιτούνται 150 υποστηρικτικά θραύσματα DNA, γεγονός το οποίο ισοδυναμεί με 300 επικαλυπτόμενες αναγνώσεις συζευγμένων άκρων. Ο αριθμός των δειγμάτων και ο συνολικός αριθμός των στοχευόμενων βάσεων επηρεάζουν την κάλυψη. Το περιεχόμενο GC και άλλο γονιδιωματικό περιεχόμενο μπορούν να επηρεάσουν την κάλυψη.
 - ▶ Η μεταβλητότητα του αριθμού αντιγράφων μπορεί να επηρεάσει το αν μια παραλλαγή αναγνωρίζεται ως ομόζυγη ή ετερόζυγη.

- ▶ Οι παραλλαγές σε ορισμένο επαναλαμβανόμενο πλαίσιο φιλτράρονται στα αρχεία VCF. Το φίλτρο επανάληψης RmXN χρησιμοποιείται για το φιλτράρισμα παραλλαγών, εάν το σύνολο ή μέρος της αλληλουχίας της παραλλαγής επαναλαμβάνεται στο γονιδίωμα αναφοράς δίπλα στη θέση της παραλλαγής. Για αντιστοίχιση παραλλαγών βλαστικής σειράς, απαιτούνται τουλάχιστον εννέα επαναλήψεις στο γονιδίωμα αναφοράς προκειμένου να φιλτραριστεί μια παραλλαγή. Λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 5 bp (R5x9).
 - ▶ Ένα indel και μια SNV σε μόνο έναν τόπο μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την αναφορά μόνο μίας παραλλαγής.
- 13 Ειδικό περιορισμό για την αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών.
- ▶ Το όργανο NextSeq 550Dx, το οποίο χρησιμοποιεί τη μονάδα Local Run Manager Somatic Variant Module για το NextSeq 550Dx, έχει σχεδιαστεί για την παροχή ποιοτικών αποτελεσμάτων για την αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών (π.χ. παρουσία σωματικής παραλλαγής με συχνότητα παραλλαγής ίση με ή μεγαλύτερη από 0,026 με τιμή ορίου ανίχνευσης 0,05).
 - ▶ Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη μονάδα Somatic Variant Module, η ελάχιστη κάλυψη ανά αμπλικόνιο που χρειάζεται για την ακριβή αντιστοίχιση των παραλλαγών είναι 450x ανά δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων. Κατά συνέπεια, απαιτούνται 450 υποστηρικτικά θραύσματα DNA ανά δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων, γεγονός το οποίο ισοδυναμεί με 900 επικαλυπτόμενες αναγνώσεις συζευγμένων άκρων. Ο αριθμός των δειγμάτων και ο συνολικός αριθμός των στοχευόμενων βάσεων επηρεάζουν την κάλυψη. Το περιεχόμενο GC και άλλο γονιδιωματικό περιεχόμενο μπορούν να επηρεάσουν την κάλυψη.
 - ▶ Για αντιστοίχιση σωματικών παραλλαγών, απαιτούνται τουλάχιστον έξι επαναλήψεις στο γονιδίωμα αναφοράς προκειμένου να φιλτραριστεί η παραλλαγή και λαμβάνονται υπόψη μόνο οι επαναλήψεις με μήκος μέχρι 3 bp (R3x6).
 - ▶ Η μονάδα Somatic Variant Module δεν μπορεί να διακρίνει τις παραλλαγές βλαστικής σειράς από τις σωματικές παραλλαγές. Η μονάδα έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση παραλλαγών σε ένα εύρος συχνοτήτων παραλλαγών, αλλά η συχνότητα παραλλαγών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των σωματικών παραλλαγών από τις παραλλαγές βλαστικής σειράς.
 - ▶ Ο φυσιολογικός ιστός στο δείγμα επηρεάζει την ανίχνευση των παραλλαγών. Το όριο ανίχνευσης που αναφέρεται βασίζεται σε μια συχνότητα παραλλαγής που είναι σχετική με το συνολικό DNA που εξάγεται τόσο από τον καρκινικό όσο και από τον φυσιολογικό ιστό.

Εξαρτήματα προϊόντος

- 1 Όργανο NextSeq 550Dx (Αρ. καταλόγου 20005715)
- 2 Στοιχεία λογισμικού για το όργανο NextSeq 550Dx, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

Εφαρμογή λογισμικού	Λειτουργία	Περιγραφή
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Ελέγχει τη λειτουργία του οργάνου	Η εφαρμογή λογισμικού NOS διαχειρίζεται τη λειτουργία του οργάνου κατά την αλληλούχιση και δημιουργεί εικόνες για χρήση από το λογισμικό Real-Time Analysis (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Εκτελεί κύρια ανάλυση	Η εφαρμογή λογισμικού RTA μετατρέπει τις εικόνες που δημιουργήθηκαν από το NOS για κάθε πλακίδιο ανά κύκλο της εκτέλεσης αλληλούχισης σε αρχεία αντιστοίχισης βάσης, τα οποία αποτελούν στοιχεία εισόδου για τις μονάδες ανάλυσης του Local Run Manager. Η εφαρμογή λογισμικού RTA δεν διαθέτει περιβάλλον χρήστη.
Local Run Manager	Περιβάλλον χρήστη για την επιλογή μονάδας	Το λογισμικό Local Run Manager είναι μια λύση ενσωματωμένη στο όργανο και προορίζεται για τη διαχείριση χρηστών, την επιλογή της κατάλληλης μονάδας ανάλυσης και την παρακολούθηση της κατάστασης.

Εφαρμογή λογισμικού	Λειτουργία	Περιγραφή
Somatic Variant Module	Εκτελεί δευτερεύουσα ανάλυση	Αυτό το λογισμικό μονάδας ανάλυσης του Local Run Manager επεξεργάζεται αντιστοιχίσεις βάσης μέσω δευτερεύουσας ανάλυσης. Η επεξεργασία περιλαμβάνει αποπολύπλεξη, δημιουργία αρχείων FASTQ, ευθυγράμμιση, αντιστοίχιση παραλλαγών και δημιουργία αναφορών. Ο αντιστοιχιστής παραλλαγής (Pisces) δημιουργεί αρχεία VCF που περιέχουν πληροφορίες για παραλλαγές που βρέθηκαν σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα γονιδίωμα αναφοράς και περιλαμβάνει και τη μετρηθείσα συχνότητα παραλλαγής.
Germline Variant Module	Εκτελεί δευτερεύουσα ανάλυση	Αυτό το λογισμικό μονάδας ανάλυσης του Local Run Manager επεξεργάζεται αντιστοιχίσεις βάσης μέσω δευτερεύουσας ανάλυσης. Η επεξεργασία περιλαμβάνει αποπολύπλεξη, δημιουργία αρχείων FASTQ, ευθυγράμμιση, αντιστοίχιση παραλλαγών και δημιουργία αναφορών. Ο αντιστοιχιστής παραλλαγής (Pisces) δημιουργεί αρχεία VCF που περιέχουν πληροφορίες για παραλλαγές που βρέθηκαν σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα γονιδίωμα αναφοράς και αναγνωρίζει κάθε παραλλαγή ως ετερόζυγη ή ομόζυγη.

Συνθήκες λειτουργίας

Στοιχείο	Προδιαγραφές
Θερμοκρασία	Η θερμοκρασία του εργαστηρίου πρέπει να διατηρείται στους 19 °C έως 25 °C (22 °C ±3 °C). Το συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας είναι το εύρος θερμοκρασίας λειτουργίας του οργάνου. Κατά τη διάρκεια μιας εκτέλεσης, μην επιτρέψετε η θερμοκρασία του περιβάλλοντος να μεταβληθεί περισσότερο από ±2°C.
Υγρασία	Διατηρείτε σχετική υγρασία χωρίς συμπύκνωση μεταξύ 20–80%.

Εξοπλισμός και υλικά

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, πωλούνται χωριστά

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 κύκλων), Αρ. καταλόγου 20028870

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων), Αρ. καταλόγου 20028871

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

Αναλώσιμα που παρέχονται από τον χρήστη για εκτελέσεις αλληλουχίας

Αναλώσιμο	Προμηθευτής	Σκοπός
Μαντηλάκια ισοπροπυλικής αλκοόλης, 70% ή Αιθανόλη, 70%	VWR, αρ. καταλόγου 95041-714 (ή αντίστοιχος) Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου	Καθαρισμός κυψελίδας ροής και γενική χρήση
Πανάκια εργαστηρίου, που δεν αφήνουν χνούδι	VWR, αρ. καταλόγου 21905-026 (ή αντίστοιχος)	Καθαρισμός κυψελίδας ροής και γενική χρήση

Αναλώσιμα που παρέχονται από τον χρήστη για συντήρηση του οργάνου

Αναλώσιμο	Προμηθευτής	Σκοπός
NaOCl, 5% (υποχλωριώδες νάτριο)	Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου 239305 (ή ισοδύναμο εργαστηριακής ποιότητας)	Έκπλυση του οργάνου μέσω της λειτουργίας μη αυτόματης έκπλυσης μετά την εκτέλεση, αραίωση στο 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, αρ. καταλόγου P7949	Έκπλυση του οργάνου μέσω των επιλογών μη αυτόματης έκπλυσης, αραίωση στο 0,05%

Αναλώσιμο	Προμηθευτής	Σκοπός
Νερό, εργαστηριακής ποιότητας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου	Έκπλυση του οργάνου (μη αυτόματη έκπλυση)
Φίλτρο αέρα	Illumina, αρ. καταλόγου 20022240	Καθαρισμός του αέρα που εισάγεται στο όργανο για ψύξη

Οδηγίες για νερό εργαστηριακής ποιότητας

Χρησιμοποιείτε πάντα νερό εργαστηριακής ποιότητας ή απιονισμένο νερό για την εκτέλεση των διαδικασιών του οργάνου. Μην χρησιμοποιείτε ποτέ νερό βρύσης. Χρησιμοποιείτε μόνο νερό με τις παρακάτω ποιότητες ή ισοδύναμες λύσεις:

- ▶ Απιονισμένο νερό
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Νερό 18 Megohm (MΩ)
- ▶ Νερό Milli-Q
- ▶ Νερό Super-Q
- ▶ Νερό ποιότητας μοριακής βιολογίας

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

ΠΡΟΣΟΧΗ Η ομοσπονδιακή νομοθεσία επιτρέπει την πώληση αυτής της συσκευής μόνο από ιατρό ή κατόπιν εντολής ιατρού, ή από άλλον επαγγελματία υγείας με άδεια ασκήσεως επαγγέλματος σύμφωνα με τη νομοθεσία της πολιτείας στην οποία ασκεί το επάγγελμά του, για χρήση ή εντολή χρήσης της συσκευής.

- 1 **Ορισμένα στοιχεία των αντιδραστηρίων που παρέχονται από την Illumina για χρήση με το όργανο NextSeq 550Dx περιέχουν δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό. Φοράτε προστατευτικό εξοπλισμό, συμπεριλαμβανομένου εξοπλισμού προστασίας για τα μάτια, γάντια και εργαστηριακή ποδιά, κατάλληλο για τον κίνδυνο έκθεσης. Τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πρέπει να αντιμετωπίζονται ως χημικά απόβλητα και να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες περιφερειακούς, εθνικούς και τοπικούς νόμους και κανονισμούς. Για πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στα φύλλα δεδομένων ασφάλειας (SDS), στη διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.**
- 2 Αναφέρετε αμέσως τυχόν σοβαρά ατυχήματα που σχετίζονται με αυτό το προϊόν στην Illumina και στις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών στα οποία είναι εγκατεστημένοι ο χρήστης και ο ασθενής.
- 3 Πρέπει να χειρίζεστε όλα τα δείγματα αίματος ως εάν να ήταν γνωστό ότι είναι μολυσματικά για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), για τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και άλλους παθογόνους παράγοντες που μεταδίδονται με το αίμα (γενικές προφυλάξεις).
- 4 Η μη τήρηση των διαδικασιών όπως περιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ή σημαντική μείωση της ποιότητας των δειγμάτων.
- 5 Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μην χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και εργαστηριακή ρόμπα κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ.
- 6 Η εφαρμογή ορθών εργαστηριακών πρακτικών και η καλή εργαστηριακή υγιεινή είναι απαραίτητες για την αποτροπή της μόλυνσης των αντιδραστηρίων, των οργάνων και των δειγμάτων γονιδιωματικού DNA από τα προϊόντα της PCR. Η μόλυνση της PCR μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή και αναξιόπιστα αποτελέσματα.
- 7 Για την αποτροπή μόλυνσης, διασφαλίστε ότι στις περιοχές πριν από την ενίσχυση και μετά την ενίσχυση υπάρχει ειδικός εξοπλισμός (π.χ. πιπέτες, άκρα πιπετών, συστοιχίες θερμομαντικών συσκευών, αναδευτήρες και συσκευές φυγοκέντρησης).

- 8 Η ζεύξη δείκτη και δείγματος πρέπει να αντιστοιχεί ακριβώς στην έντυπη διάταξη πλάκας. Το Local Run Manager συμπληρώνει αυτόματα τους εκκινητές ευρετηρίου που σχετίζονται με τα ονόματα των δειγμάτων, κατά την είσοδό τους στη μονάδα. Συνιστάται ο χρήστης να επαληθεύει τους εκκινητές ευρετηρίου που σχετίζονται με τα δείγματα πριν από την έναρξη της εκτέλεσης αλληλούχισης. Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ δείγματος και διάταξης πλάκας έχουν ως αποτέλεσμα απώλεια θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων και εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων.
- 9 Συνιστάται θερμά η εγκατάσταση λογισμικού προστασίας από ιούς που παρέχεται από τον χρήστη, για την προστασία του υπολογιστή από ιούς. Συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήστη για οδηγίες σχετικά με την εγκατάσταση.
- 10 Μην χειρίζεστε το NextSeq 550Dx ενώ έχει αφαιρεθεί οποιοσδήποτε από τους πίνακες. Ο χειρισμός του οργάνου ενώ έχει αφαιρεθεί οποιοσδήποτε από τους πίνακες δημιουργεί πιθανή έκθεση στην τάση δικτύου και σε εναλλασσόμενες τάσεις.
- 11 Μην αγγίζετε τη βάση της κυψελίδας ροής μέσα στο διαμέρισμα της κυψελίδας ροής. Η συσκευή θέρμανσης σε αυτό το διαμέρισμα λειτουργεί σε θερμοκρασία από 22 °C έως 95 °C και μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα.
- 12 Το όργανο ζυγίζει περίπου 185 lb και μπορεί να προκαλέσει σοβαρό τραυματισμό σε περίπτωση πτώσης ή εσφαλμένης χρήσης.

Οδηγίες χρήσης

Οι παρακάτω οδηγίες χρήσης προορίζονται για τη λειτουργία των μονάδων Germline Variant Module και Somatic Variant Module σε διαγνωστική λειτουργία στο όργανο NextSeq 550Dx με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) ή με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).

Εισαγωγή πληροφοριών εκτέλεσης

Για λεπτομερείς οδηγίες, δείτε τον Οδηγό αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513) και τον αντίστοιχο οδηγό μονάδας του Local Run Manager.

Καθορισμός παραμέτρων

- 1 Συνδεθείτε στο Local Run Manager.
- 2 Επιλέξτε **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) και **Somatic Variant** ή **Germline Variant**.
- 3 Εισαγάγετε ένα όνομα εκτέλεσης που ταυτοποιεί την εκτέλεση από την αλληλούχισή έως την ανάλυση. Χρησιμοποιήστε αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, κενά, κάτω παύλες ή παύλες.
- 4 **[Προαιρετικό]** Εισαγάγετε μια περιγραφή της εκτέλεσης για ευκολότερη ταυτοποίηση της εκτέλεσης. Χρησιμοποιήστε αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, κενά, κάτω παύλες ή παύλες.
- 5 Επιλέξτε τον αριθμό των δειγμάτων και το σύνολο των ευρετηρίων από την αναπτυσσόμενη λίστα. Κατά την επιλογή σας, λάβετε υπόψη σας τις παρακάτω πληροφορίες.
 - ▶ Η αναπτυσσόμενη λίστα περιλαμβάνει αριθμούς δειγμάτων με ένα σύνολο ευρετηρίων. Για παράδειγμα, το «24-Set 1» υποδεικνύει ότι υπάρχουν 24 δείγματα προς εξέταση, με ευρετήρια από το σύνολο ευρετηρίων 1.
 - ▶ Οι αριθμοί των συνόλων των ευρετηρίων αναφέρονται σε διαφορετικά σύνολα ζευγών ευρετηρίων i5 και i7. Το Σύνολο 1 και το Σύνολο 2 προσφέρουν και τα δύο ποικιλομορφία ευρετηρίων. Παρέχονται δύο σύνολα ευρετηρίων για την αποφυγή εξάντλησης ενός μόνο συνόλου.
 - ▶ Επιλέξτε τον αριθμό δειγμάτων που πλησιάζει περισσότερο στον αριθμό των δειγμάτων που θα υποβληθούν σε εξέταση. Εάν στη λίστα δεν υπάρχει ο ακριβής αριθμός των δειγμάτων, επιλέξτε τον πλησιέστερο αριθμό, αλλά φροντίστε να είναι μικρότερος από τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων. Για παράδειγμα, αν πρόκειται να εξεταστούν 18 δείγματα, επιλέξτε 16 δείγματα.
 - ▶ Τα προτεινόμενα βοηθία δείγματος και οι συνδυασμοί ευρετηρίων που πληρούν τις απαιτήσεις ποικιλομορφίας ευρετηρίων επισημαίνονται με πράσινο χρώμα.

Εισαγωγή αρχείων δελτίου δείγματος για την εκτέλεση

- 1 Βεβαιωθείτε ότι τα δελτία δείγματος που θέλετε να εισαγάγετε είναι διαθέσιμα σε μια προσβάσιμη θέση στο δίκτυο ή σε μια μονάδα USB.
- 2 Επιλέξτε **Import Manifests** (Εισαγωγή δελτίων δείγματος).
- 3 Μεταβείτε στο αρχείο του δελτίου δείγματος και επιλέξτε τα δελτία δείγματος που θέλετε να προσθέσετε.


ΣΗΜΕΙΩΣΗ Για να είναι διαθέσιμα τα αρχεία δελτίων δείγματος για όλες τις εκτελέσεις με τη μονάδα ανάλυσης Germline Variant ή Somatic Variant, προσθέστε τα δελτία δείγματος με τη λειτουργία Module Settings (Ρυθμίσεις μονάδας). Για τη λειτουργία αυτή απαιτούνται άδειες επιπέδου διαχειριστή. Για περισσότερες λεπτομέρειες, βλ. *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513)*.

Καθορισμός δειγμάτων για την εκτέλεση


Καθορίστε τα δείγματα για την εκτέλεση χρησιμοποιώντας μία από τις επιλογές και τις οδηγίες που ακολουθούν.

- ▶ **Μη αυτόματη εισαγωγή δειγμάτων**—Χρησιμοποιήστε τον κενό πίνακα στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης).
- ▶ **Εισαγωγή δειγμάτων**—Μεταβείτε σε ένα εξωτερικό αρχείο με μορφή τιμών χωρισμένων με κόμμα (*.csv). Στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης) υπάρχει ένα πρότυπο προς λήψη.

Μη αυτόματη εισαγωγή δειγμάτων

- 1 Εισαγάγετε ένα μοναδικό όνομα δείγματος (**Μονάδα ανάλυσης Somatic Variant Module**) ή ένα αναγνωριστικό δείγματος (**Μονάδα ανάλυσης Germline Variant Module**).
Χρησιμοποιήστε αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, παύλες ή κάτω παύλες.
- 2 **[Προαιρετικό]** Για δείγματα με θετικούς ή αρνητικούς μάρτυρες, κάντε δεξί κλικ και επιλέξτε τον τύπο του μάρτυρα. Ο μάρτυρας στο ένα βοθρίο δείγματος συμπληρώνει αυτόματα το αντίστοιχο βοθρίο στην άλλη δεξαμενή με τον ίδιο μάρτυρα.
- 3 **[Προαιρετικό]** Εισαγάγετε μια περιγραφή δείγματος στο πεδίο Sample Description (Περιγραφή δείγματος).
Χρησιμοποιήστε αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, παύλες ή κάτω παύλες.
- 4 Επιλέξτε έναν προσαρμογέα Ευρετηρίου 1 από την αναπτυσσόμενη λίστα Index 1 (Ευρετήριο 1) (i7).
Όταν χρησιμοποιείτε τα προτεινόμενα βοθρία δείγματος, το λογισμικό συμπληρώνει αυτόματα προσαρμογείς ευρετηρίου i7 και i5 που πληρούν τις απαιτήσεις ποικιλομορφίας ευρετηρίων. Εάν στη λίστα δεν υπάρχει ακριβώς ο αριθμός των δειγμάτων προς εξέταση, φροντίστε να επιλέξετε προσαρμογείς ευρετηρίου για επιπλέον βοθρία.
- 5 Επιλέξτε έναν προσαρμογέα Ευρετηρίου 2 από την αναπτυσσόμενη λίστα Index 2 (Ευρετήριο 2) (i5).
- 6 Επιλέξτε ένα αρχείο δελτίου δείγματος από την αναπτυσσόμενη λίστα Manifest (Δελτίο δείγματος).
Για τα δείγματα στη Δεξαμενή A απαιτείται διαφορετικό δελτίο δείγματος από τα δείγματα στη Δεξαμενή B.
- 7 Ορίστε μια επιλογή για προβολή, εκτύπωση ή αποθήκευση της διάταξης πλάκας ως αναφορά για την προετοιμασία βιβλιοθηκών:
 - Επιλέξτε το εικονίδιο  **Print** (Εκτύπωση) για να εμφανίσετε τη διάταξη της πλάκας. Επιλέξτε **Print** (Εκτύπωση) για την εκτύπωση της διάταξης πλάκας.
 - Επιλέξτε **Export** (Εξαγωγή) για να εξαγάγετε τις πληροφορίες δείγματος σε ένα εξωτερικό αρχείο.
- 8 Επιλέξτε **Save Run** (Αποθήκευση εκτέλεσης).

Εισαγωγή δειγμάτων

- 1 Επιλέξτε **Import Samples** (Εισαγωγή δειγμάτων) και μεταβείτε στη θέση του αρχείου με τις πληροφορίες του δείγματος. Υπάρχουν δύο τύποι αρχείων που μπορείτε να εισαγάγετε.
 - Επιλέξτε **Template** (Πρότυπο) στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης) για να δημιουργήσετε μια νέα διάταξη πλάκας. Το αρχείο του προτύπου περιέχει τις σωστές επικεφαλίδες στηλών για την εισαγωγή. Εισαγάγετε τις πληροφορίες δείγματος σε κάθε στήλη για τα δείγματα της εκτέλεσης. Διαγράψτε τις πληροφορίες των παραδειγμάτων στα κελιά που δεν χρησιμοποιούνται και, στη συνέχεια, αποθηκεύστε το αρχείο.
 - Χρησιμοποιήστε ένα αρχείο πληροφοριών δείγματος που έχει εξαχθεί από τη μονάδα Germline Variant ή τη μονάδα Somatic Variant χρησιμοποιώντας τη λειτουργία Export (Εξαγωγή).
- 2 Επιλέξτε το εικονίδιο  **Print** (Εκτύπωση) για να εμφανίσετε τη διάταξη της πλάκας.
- 3 Επιλέξτε **Print** (Εκτύπωση) για να εκτυπώσετε τη διάταξη της πλάκας ως αναφορά για την προετοιμασία βιβλιοθηκών.
- 4 Επιλέξτε **Save Run** (Αποθήκευση εκτέλεσης).

Προετοιμασία της κασέτας αντιδραστηρίων

Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε προσεκτικά τις οδηγίες της κασέτας αντιδραστηρίων για επιτυχημένη αλληλούχιση.

- 1 Πάρτε την κασέτα αντιδραστηρίων από τον χώρο αποθήκευσης όπου βρίσκεται σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.
- 2 Επιλέξτε μία από τις παρακάτω μεθόδους για την απόψυξη των αντιδραστηρίων. Μην βυθίζετε την κασέτα. Μετά την απόψυξη της κασέτας, στεγνώστε την προτού περάσετε στο επόμενο βήμα.

Θερμοκρασία	Χρόνος απόψυξης	Όριο σταθερότητας
Λουτρό ύδατος σε θερμοκρασία 15 °C έως 30 °C	60 λεπτά	Να μην υπερβαίνονται οι 6 ώρες
2 °C έως 8 °C	7 ώρες	Να μην υπερβαίνονται οι 5 ημέρες

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Εάν αποψύχετε πάνω από μία κασέτα στο ίδιο λουτρό ύδατος, αυξήστε τον χρόνο της απόψυξης.

- 3 Αναποδογυρίστε την κασέτα πέντε φορές για να αναμειχθούν τα αντιδραστήρια.
- 4 Επιθεωρήστε το κάτω μέρος της κασέτας για να βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια έχουν αποψυχθεί και ότι δεν υπάρχουν ιζήματα. Επιβεβαιώστε ότι οι θέσεις 29, 30, 31, και 32 έχουν αποψυχθεί, καθώς είναι οι μεγαλύτερες και χρειάζονται τον περισσότερο χρόνο απόψυξης.
- 5 Χτυπήστε απαλά την κασέτα στον πάγκο για να περιορίσετε τις φυσαλίδες αέρα.
Για βέλτιστα αποτελέσματα, φορτώστε απευθείας το δείγμα και καθορίστε τις παραμέτρους της εκτέλεσης.

Προετοιμασία της κυψελίδας ροής

- 1 Πάρτε ένα νέο κιβώτιο κυψελίδας ροής από τον χώρο αποθήκευσης όπου βρίσκεται σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C.
- 2 Αφαιρέστε την αλουμινένια συσκευασία από το κιβώτιο και αφήστε την σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

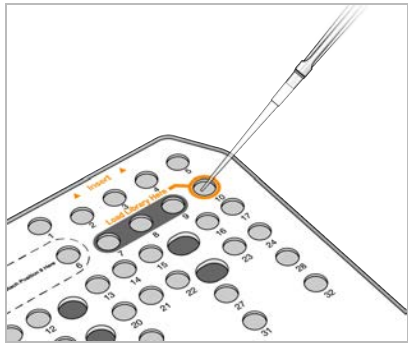
Προετοιμασία βιβλιοθηκών για αλληλούχιση

Εκτελέστε αποδιάταξη και αραίωση στις βιβλιοθήκες σας σε όγκο φόρτωσης 1,3 ml. Στην πράξη, η συγκέντρωση της φόρτωσης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την προετοιμασία των βιβλιοθηκών και τις μεθόδους ποσοτικοποίησης. Η αραίωση των βιβλιοθηκών των δειγμάτων εξαρτάται από την πολυπλοκότητα των ομάδων ολιγονουκλεοτιδίων. Για οδηγίες σχετικά με τον τρόπο προετοιμασίας των βιβλιοθηκών δειγμάτων προς αλληλούχιση, συμπεριλαμβανομένης της αραίωσης και της ομαδοποίησης των βιβλιοθηκών, ανατρέξτε στην ενότητα με τις Οδηγίες χρήσης για το αντίστοιχο kit προετοιμασίας βιβλιοθηκών. Στο NextSeq 550Dx η βελτιστοποίηση της πυκνότητας των συστάδων είναι απαραίτητη.

Φόρτωση βιβλιοθηκών στην κασέτα αντιδραστηρίων

- 1 Χρησιμοποιώντας ένα πανί που δεν αφήνει χνούδι, καθαρίστε τη στεγανοποίηση αλουμινίου που καλύπτει τη δεξαμενή αρ. 10 με ετικέτα **Load Library Here** (Φόρτωση βιβλιοθήκης εδώ).
- 2 Τρυπήστε τη στεγανοποίηση με ένα καθαρό άκρο πιπέτας 1 ml.
- 3 Φορτώστε 1,3 ml προετοιμασμένων βιβλιοθηκών στη δεξαμενή αρ. 10 με ετικέτα **Load Library Here** (Φόρτωση βιβλιοθήκης εδώ). Μην αγγίζετε τη στεγανοποίηση αλουμινίου κατά τη διανομή των βιβλιοθηκών.

Εικόνα 1 Φόρτωση βιβλιοθηκών



Καθορισμός παραμέτρων εκτέλεσης αλληλούχισης

- 1 Συνδεθείτε στο NextSeq 550Dx με τον κωδικό πρόσβασής σας για το λογισμικό Local Run Manager.
- 2 Από την αρχική οθόνη του λογισμικού NOS, επιλέξτε **Sequence** (Αλληλούχια).
- 3 Επιλέξτε μια εκτέλεση από τη λίστα και, στη συνέχεια, επιλέξτε **Next** (Επόμενο).
Ανοίγει μια σειρά από οθόνες καθορισμού παραμέτρων εκτέλεσης με την εξής σειρά: Load Flow Cell (Φόρτωση κυψελίδας ροής), Load Buffer Cartridge (Φόρτωση κασέτας ρυθμιστικών διαλυμάτων), Load Reagent Cartridge (Φόρτωση κασέτας αντιδραστηρίων) και Pre-run Check (Έλεγχος πριν από την εκτέλεση).
- 4 Όταν εμφανιστεί η οθόνη Load Flow Cell (Φόρτωση κυψελίδας ροής), καθαρίστε και, στη συνέχεια, φορτώστε την κυψελίδα ροής.
 - ▶ Αφαιρέστε την κυψελίδα ροής από την αλουμινένια συσκευασία.
 - ▶ Ανοίξτε τη διάφανη πλαστική αναδιπλούμενη συσκευασία και αφαιρέστε την κυψελίδα ροής.
 - ▶ Καθαρίστε τη γυάλινη επιφάνεια της κυψελίδας ροής με μαντηλάκι αλκοόλης που δεν αφήνει χνούδι. Στεγνώστε τη γυάλινη επιφάνεια με πανάκι εργαστηρίου που δεν αφήνει χνούδι.
 - ▶ Βεβαιωθείτε ότι η γυάλινη επιφάνεια της κυψελίδας ροής είναι καθαρή. Εάν είναι απαραίτητο, επαναλάβετε το βήμα του καθαρισμού.
 - ▶ Αφαιρέστε τη χρησιμοποιημένη κυψελίδα ροής από προηγούμενη εκτέλεση.
 - ▶ Ευθυγραμμίστε την κυψελίδα ροής επάνω από τους πύρους ευθυγράμμισης και τοποθετήστε την κυψελίδα ροής επάνω στη βάση.
- 5 Επιλέξτε **Load** (Φόρτωση).
Η θύρα κλείνει αυτόματα, το αναγνωριστικό της κυψελίδας ροής εμφανίζεται στην οθόνη και γίνεται έλεγχος των αισθητήρων.
- 6 Ακολουθήστε τις οδηγίες του λογισμικού για να αδειάσετε το δοχείο χρησιμοποιημένων αντιδραστηρίων, φορτώστε την κασέτα ρυθμιστικών διαλυμάτων του NextSeq 550Dx, και φορτώστε την κασέτα αντιδραστηρίων του NextSeq 550Dx.
Όταν φορτωθούν οι κασέτες ρυθμιστικών διαλυμάτων και αντιδραστηρίων του NextSeq 550Dx, το λογισμικό διαβάζει και καταγράφει το RFID. Τα αναγνωριστικά των κασετών ρυθμιστικών διαλυμάτων και αντιδραστηρίων εμφανίζονται στην οθόνη και γίνεται έλεγχος των αισθητήρων.
- 7 Όταν ολοκληρωθεί ο αυτόματος έλεγχος πριν από την εκτέλεση, επιλέξτε **Start** (Έναρξη). (Δεν απαιτείται αν έχει οριστεί αυτόματη εκκίνηση στη διαμόρφωση.)
- 8 Κατά την έναρξη της εκτέλεσης, ανοίγει η οθόνη Sequencing (Αλληλούχισι). Σε αυτήν την οθόνη γίνεται μια οπτική αναπαράσταση της εκτέλεσης που βρίσκεται σε εξέλιξη, συμπεριλαμβανομένων και των εντάσεων και των βαθμολογιών ποιότητας (Βαθμολογίες ποιότητας).

Αποτελέσματα

Το λογισμικό Real-Time Analysis (RTA) εκτελεί ανάλυση εικόνων και αντιστοίχιση βάσης και εκχωρεί μια βαθμολογία ποιότητας σε κάθε βάση για κάθε κύκλο αλληλούχισης. Όταν ολοκληρωθεί η κύρια ανάλυση, η επιλεγμένη μονάδα του Local Run Manager στο όργανο NextSeq 550Dx ξεκινά τη δευτερεύουσα ανάλυση αυτόματα. Οι διαδικασίες δευτερεύουσας ανάλυσης που περιγράφονται στο παρόν αφορούν τη μονάδα Gemline Variant Module και τη μονάδα Somatic Variant Module.

Αποπολύπλεξη

Κατά την αποπολύπλεξη γίνεται μια σύγκριση κάθε αλληλουχίας ανάγνωσης ευρετηρίου με τις αλληλουχίες ευρετηρίου που έχουν οριστεί για την εκτέλεση. Σε αυτό το βήμα δεν λαμβάνονται υπόψη τιμές ποιότητας.

Οι αλληλουχίες ευρετηρίου ταυτοποιούνται με τα παρακάτω βήματα:

- ▶ Τα δείγματα αριθμούνται από το 1 με βάση τη σειρά με την οποία αναγράφονται για την εκτέλεση.
- ▶ Ο αριθμός δείγματος 0 προορίζεται για συστάδες που δεν αντιστοιχίστηκαν σε δείγμα.
- ▶ Οι συστάδες αντιστοιχίζονται σε δείγμα όταν υπάρχει απόλυτη αντιστοιχία της αλληλουχίας ευρετηρίου ή όταν υπάρχει ένας και μία αναντιστοιχία ανά ανάγνωση ευρετηρίου.

Δημιουργία αρχείου FASTQ

Μετά την αποπολύπλεξη, το λογισμικό δημιουργεί ενδιάμεσα αρχεία ανάλυσης σε μορφή FASTQ, η οποία είναι μια μορφή κειμένου που χρησιμοποιείται για την αναπαράσταση αλληλουχιών. Τα αρχεία FASTQ περιέχουν αναγνώσεις για κάθε δείγμα και τις σχετικές βαθμολογίες ποιότητας. Οι συστάδες που δεν πέρασαν το φίλτρο αποκλείονται.

Κάθε αρχείο FASTQ περιέχει αναγνώσεις για ένα μόνο δείγμα και το όνομα του δείγματος περιλαμβάνεται στο όνομα του αρχείου FASTQ. Στη μονάδα Gemline Variant Module και στη μονάδα Somatic Variant Module, δημιουργούνται οκτώ αρχεία FASTQ ανά δείγμα ανά δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων, τέσσερα από την Ανάγνωση 1 και τέσσερα από την Ανάγνωση 2, τα οποία δημιουργούν ένα σύνολο από 8 και 16 αρχεία FASTQ ανά δείγμα για τη μονάδα Gemline και τη μονάδα Somatic, αντίστοιχα. Τα αρχεία FASTQ είναι τα βασικά στοιχεία εισόδου για την ευθυγράμμιση.

Ευθυγράμμιση

Στο βήμα της ευθυγράμμισης, ο αλγόριθμος Smith-Waterman με ζώνες ευθυγραμμίζει συστάδες από κάθε δείγμα βάσει αλληλουχιών αμπλικονίων που καθορίζονται στο αρχείο δελτίου δείγματος.

Ο αλγόριθμος Smith-Waterman με ζώνες εκτελεί ημικαθολικές ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών για τον καθορισμό παρεμφερών περιοχών μεταξύ δύο αλληλουχιών. Αντί της σύγκρισης του συνόλου της αλληλουχίας, ο αλγόριθμος Smith-Waterman συγκρίνει τμήματα όλων των πιθανών τιμών μήκους.

Κάθε ανάγνωση συζευγμένων άκρων αξιολογείται ως προς την ευθυγράμμισή της με τις αλληλουχίες της αντίστοιχης κεφαλής για τη συγκεκριμένη ανάγνωση.

- ▶ Η ανάγνωση 1 αξιολογείται ως προς το αντίστροφο συμπλήρωμα του Downstream Locus-Specific Oligos (DLSO).
- ▶ Η ανάγνωση 2 αξιολογείται ως προς το Upstream Locus-Specific Oligos (ULSO).
- ▶ Εάν η αρχή μιας ανάγνωσης ταιριάζει με μια αλληλουχία κεφαλής με όχι περισσότερες από μία αναντιστοιχία, το πλήρες μήκος της ανάγνωσης ευθυγραμμίζεται ως προς τον στόχο του αμπλικονίου αυτής της αλληλουχίας.
- ▶ Εάν η αρχή μιας ανάγνωσης ταιριάζει με μια αλληλουχία κεφαλής με όχι περισσότερες από τρεις διαφορές (αναντιστοιχίες ή μεταβολές λόγω αρχικών indel), το πλήρες μήκος της ανάγνωσης ευθυγραμμίζεται ως προς τον στόχο του αμπλικονίου αυτής της αλληλουχίας.
- ▶ Τα indel με DLSO και ULSO δεν παρατηρούνται, δεδομένης της χημείας του προσδιορισμού.

Οι ευθυγραμμίσεις φιλτράρονται από τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης βάσει των ποσοστών αναντιστοιχίας, είτε σε σχέση με την περιοχή ενδιαφέροντος είτε με ολόκληρο το αμπλικόνιο, ανάλογα με το μήκος του αμπλικονίου. Οι φιλτραρισμένες ευθυγραμμίσεις εγγράφονται ως αρχεία ευθυγράμμισης ως μη ευθυγραμμισμένα στοιχεία και δεν χρησιμοποιούνται στην αντιστοίχιση παραλλαγής.

Αντιστοίχιση παραλλαγής

Ο αντιστοιχιστής παραλλαγής *Pisces* έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να πραγματοποιεί αντιστοιχίσεις SNV και αντιστοιχίσεις παραλλαγών indel από βιβλιοθήκες που έχουν προετοιμαστεί για το όργανο.

Αναφορές και πρόσθετα αρχεία εξόδου

Οι μονάδες ανάλυσης παραλλαγών δημιουργούν αναφορές σε μορφή αρχείων PDF και αρχείων κειμένου οριοθετημένων με σηλοθέτες (*.txt), στις οποίες αναφέρονται τιμές μέτρησης, όπως το βάθος της αλληλούχισης και οι αριθμοί των παραλλαγών. Οι μονάδες δημιουργούν και αρχεία εξόδου, όπως αρχεία VCF και αρχεία genome Variant Call Format (gVCF) για εφαρμογές αντιστοίχισης παραλλαγών.

Διαδικασίες ελέγχου ποιότητας

Το λογισμικό NextSeq 550Dx αξιολογεί κάθε εκτέλεση, κάθε δείγμα και κάθε αντιστοίχιση βάσης σε σχέση με τιμές μέτρησης ελέγχου ποιότητας. Επίσης, κατά τη διαδικασία προετοιμασίας βιβλιοθηκών, συνιστώνται θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, οι οποίοι πρέπει να υποβάλλονται σε αξιολόγηση. Αξιολογήστε τους μάρτυρες ως εξής:

- **Αρνητικός μάρτυρας (αρνητικός μάρτυρας ελέγχου) ή άλλος αρνητικός μάρτυρας**— Πρέπει να δημιουργεί το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Αν ο αρνητικός μάρτυρας δημιουργήσει αποτέλεσμα άλλο από το αναμενόμενο, τότε υπάρχει πιθανό σφάλμα στην παρακολούθηση δείγματος, μπορεί να έχει γίνει εσφαλμένη καταγραφή εκκινητών ευρετηρίου ή υπάρχει ενδεχόμενο μόλυνσης.
- **Δείγμα θετικού μάρτυρα**— Πρέπει να δημιουργεί το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Αν ο θετικός μάρτυρας δημιουργήσει αποτέλεσμα άλλο από το αναμενόμενο, τότε υπάρχει πιθανό σφάλμα στην παρακολούθηση δείγματος ή μπορεί να έχει γίνει εσφαλμένη καταγραφή εκκινητών ευρετηρίου.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης για το όργανο NextSeq 550Dx καθορίστηκαν με τις μονάδες Gemline Variant Module και Somatic Variant Module με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx και το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και επιβεβαιώθηκαν με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Στις μελέτες ερευνήθηκαν τα εξής: ευρετηρίαση δειγμάτων, μεταφορά δειγμάτων, εισαγωγή στοιχείων DNA, ευαισθησία ανάλυσης (Όριο τυφλού / Όριο ανίχνευσης), ορθότητα, ακρίβεια, σύγκριση μεθόδων και αναπαραγωγιμότητα.

Οι μελέτες ανάλυσης με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) είχαν σχεδιαστεί για την αξιολόγηση των ισχυρισμών περί απόδοσης που είχαν οριστεί στο παρελθόν με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων). Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα kit αντιδραστηρίων (v2 και v2.5) έχουν συγκρίσιμη απόδοση με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Δείτε το *Ένθετο συσκευασίας TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* για χαρακτηριστικά απόδοσης που σχετίζονται με παράγοντες προ της ανάλυσης, όπως οι μέθοδοι εξαγωγής ή οι παρεμβαλλόμενες ουσίες.

Ορισμοί των υπολογισμών που χρησιμοποιούνται στα χαρακτηριστικά απόδοσης

- 1 Το θετικό ποσοστό συμφωνίας (PPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που ταξινομούνται ως παραλλαγές από μια μέθοδο αναφοράς που αναφέρει σωστά ο προσδιορισμός.
 - ▶ (Αριθμός περιοχών παραλλαγών που αναφέρθηκαν σωστά από τον προσδιορισμό) / (Συνολικός αριθμός περιοχών παραλλαγών)

Οι περιοχές παραλλαγών που αναφέρθηκαν από τον προσδιορισμό που συμφωνούν με τη μέθοδο αναφοράς είναι αληθώς θετικές (TP). Οι περιοχές παραλλαγών που αναφέρθηκαν ως αντιστοιχίσεις αναφοράς ή ως διαφορετικές αντιστοιχίσεις παραλλαγής από τον προσδιορισμό είναι ψευδώς αρνητικές (FN).

- 2 Το αρνητικό ποσοστό συμφωνίας (NPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που ταξινομούνται ως άγριου τύπου από μια μέθοδο αναφοράς που αναφέρει σωστά ο προσδιορισμός.
 - ▶ (Αριθμός περιοχών άγριου τύπου που αναφέρθηκαν σωστά από τον προσδιορισμό) / (Συνολικός αριθμός περιοχών άγριου τύπου)

Οι περιοχές άγριου τύπου που αναφέρθηκαν από τον προσδιορισμό και συμφωνούν με τη μέθοδο αναφοράς είναι αληθώς αρνητικές (TN). Οι περιοχές άγριου τύπου που αναφέρονται ως παραλλαγές από τον προσδιορισμό είναι ψευδώς θετικές (FP).
- 3 Το συνολικό ποσοστό συμφωνίας (OPA) υπολογίζεται ως το ποσοστό των περιοχών που αναφέρονται σωστά από τον προσδιορισμό και σχετίζονται με μια μέθοδο αναφοράς.
 - ▶ [(Αριθμός περιοχών παραλλαγής που αναφέρονται σωστά από τον προσδιορισμό) + (Αριθμός περιοχών άγριου τύπου που αναφέρονται από τον προσδιορισμό)] / [(Συνολικός αριθμός περιοχών παραλλαγής) + (Συνολικός αριθμός περιοχών άγριου τύπου)]
- 4 Οι υπολογισμοί PPA, NPA και OPA δεν περιλαμβάνουν μη αντιστοιχίσεις (περιοχές παραλλαγής ή περιοχές αναφοράς που δεν πληρούν ένα ή περισσότερα φίλτρα ποιότητας).
- 5 Το ποσοστό αντιστοίχισης αυτοσωμάτων υπολογίζεται ως ο συνολικός αριθμός των περιοχών που διέρχονται από τα φίλτρα διαιρούμενος με τον συνολικό αριθμό των θέσεων που υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση για τα χρωμοσώματα 1–22. Τα χρωμοσώματα X και Y εξαιρούνται. Σε αυτήν τη μέτρηση δεν λαμβάνεται υπόψη η συμφωνία των αντιστοιχίσεων με τη μέθοδο αναφοράς.

Απόδοση του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων)

Ευρετηρίαση δειγμάτων

Οι εκκινητές ευρετηρίου δειγμάτων, οι οποίοι προστίθενται κατά την προετοιμασία των βιβλιοθηκών, εκχωρούν μια μοναδική αλληλουχία σε κάθε DNA δείγματος. Αυτές οι μοναδικές αλληλουχίες επιτρέπουν την ομαδοποίηση πολλών δειγμάτων σε μία εκτέλεση αλληλούχισης. Η ευρετηρίαση δειγμάτων χρησιμοποιείται τόσο για τη ροή εργασιών βλαστικής σειράς όσο και για τη ροή εργασιών σωματικών παραλλαγών. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν ο ορισμός του ελάχιστου (8) και του μέγιστου (96) αριθμού δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε μία εκτέλεση αλληλούχισης με το όργανο NextSeq 550Dx. Οκτώ μοναδικά δείγματα Platinum Genome υποβλήθηκαν σε εξέταση με 12 διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών ευρετηρίου ανά δείγμα. Τα αποτελέσματα δειγμάτων από τέσσερις εκτελέσεις αλληλούχισης που πραγματοποιήθηκαν με τη μονάδα Germline Variant Module συγκρίθηκαν με τα Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0.

Για το πρώτο σύνολο εκτελέσεων, υποβλήθηκαν σε εξέταση 96 μοναδικές ευρετηριασμένες βιβλιοθήκες δειγμάτων με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις ανά αλυσίδα και στα 23 ανθρώπινα χρωμοσώματα, για να επαληθευτεί η ικανότητα του προσδιορισμού να δημιουργεί συνεπείς αντιστοιχίσεις βάσεις γονότυπου για ένα συγκεκριμένο δείγμα, σε διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών ευρετηρίου. Για το δεύτερο σύνολο εκτελέσεων, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση οκτώ μοναδικές ευρετηριασμένες βιβλιοθήκες δειγμάτων σε δύο εκτελέσεις αλληλούχισης, για να επαληθευτεί ο ελάχιστος υποστηριζόμενος αριθμός ευρετηρίων.

Για τις εκτελέσεις 96 δεικτών, το PPA για SNV κυμάνθηκε από 98,7% έως 100%, το PPA για προσθήκες και διαγραφές ήταν 100% και το NPA ήταν 100% για κάθε έναν από τους 96 συνδυασμούς δεικτών. Οι εκτελέσεις 8 δεικτών είχαν τιμές PPA 100% (SNV, προσθήκες και διαγραφές) και NPA 100% για κάθε έναν από τους οκτώ συνδυασμούς δεικτών.

Μεταφορά δείγματος

Το όργανο NextSeq 550Dx επιτρέπει την αλληλούχιση πολλών δειγμάτων και μαρτύρων σε μία εκτέλεση αλληλούχισης. Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για την αξιολόγηση του βαθμού της μεταφοράς δείγματος σε μια εκτέλεση αλληλούχισης (εντός της εκτέλεσης) και μεταξύ εκτελέσεων αλληλούχισης (από εκτέλεση σε εκτέλεση). Δύο δείγματα Platinum Genome, ένα αρσενικό και ένα θηλυκό, εξετάστηκαν με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις (150 αμπλικόνια) σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα, συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωμάτων και των δύο φύλων. Οι βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε

αλληλούχιση με το όργανο NextSeq 550Dx με τη μονάδα Germline Variant Module. Η μεταφορά αρσενικών δειγμάτων σε θηλυκά δείγματα παρατηρήθηκε από την παρουσία αναγνώσεων αμπλικονίου του χρωμοσώματος Y στα θηλυκά δείγματα.

Η μεταφορά εντός εκτέλεσης μπορεί να γίνει κατά τη διάρκεια της δημιουργίας συστάδων, κατά την αντιστοίχιση βάσεων σε κύκλους ευρετηρίασης και κατά την αποπολύπλεξη δειγμάτων. Για την εξέταση της μεταφοράς δειγμάτων εντός εκτέλεσης αλληλούχισης, μια δεξαμενή βιβλιοθηκών, η οποία αποτελείται από 46 αντίγραφα για κάθε αρσενικό και θηλυκό δείγμα, συν τέσσερις αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου, υποβλήθηκε σε αλληλούχιση μία φορά στο όργανο NextSeq 550Dx. Η μεταφορά δείγματος εντός εκτέλεσης αξιολογήθηκε μέσω της σύγκρισης της κάλυψης του αμπλικονίου του χρωμοσώματος Y κάθε θηλυκού αντιγράφου με τη μέση κάλυψη αμπλικονίου του χρωμοσώματος Y όλων των αρσενικών αντιγράφων στη δεξαμενή. Η διάμεσος που παρατηρήθηκε στη μεταφορά εντός εκτέλεσης ήταν 0,084%.

Για την εξέταση της μεταφοράς δείγματος από εκτέλεση σε εκτέλεση, προετοιμάστηκαν δύο δεξαμενές βιβλιοθηκών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση διαδοχικά σε ένα όργανο NextSeq 550Dx. Η πρώτη δεξαμενή περιελάμβανε 46 αντίγραφα θηλυκών δειγμάτων συν δύο αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου. Η δεύτερη δεξαμενή περιελάμβανε 46 αντίγραφα αρσενικών δειγμάτων συν δύο αρνητικούς μάρτυρες ελέγχου. Και στις δύο δεξαμενές χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύνολο προσαρμογέων δείκτη. Η θηλυκή δεξαμενή υποβλήθηκε σε αλληλούχιση πρώτη και, στη συνέχεια, έλαβε χώρα μια ακόμα εκτέλεση αλληλούχισης με την αρσενική δεξαμενή. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια επαναληπτική εκτέλεση αλληλούχισης της θηλυκής δεξαμενής. Η μεταφορά δείγματος από εκτέλεση σε εκτέλεση αξιολογήθηκε μέσω της σύγκρισης της κάλυψης του αμπλικονίου του χρωμοσώματος Y μεταξύ των αντίστοιχων αντιγράφων της επαναληπτικής εκτέλεσης της θηλυκής δεξαμενής και της εκτέλεσης της αρσενικής δεξαμενής. Η διάμεσος που παρατηρήθηκε στη μεταφορά από εκτέλεση σε εκτέλεση ήταν 0,0076%.

Στοιχεία εισόδου DNA

Αίμα (Germline)

Το εύρος στοιχείων εισόδου DNA αίματος για την προετοιμασία βιβλιοθηκών TruSeq Custom Amplicon Kit Dx με τη ροή εργασιών της μονάδας Germline Variant Module έχει οριστεί για το όργανο NextSeq 550Dx. Αυτό το εύρος αξιολογήθηκε μέσω της εκτέλεσης μιας μελέτης εν σειρά αραιώσεων με 13 δείγματα Platinum Genome και με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα. Η βιβλιοθήκη υποβλήθηκε σε αλληλούχιση σε δύο όργανα NextSeq 550Dx με μία παρτίδα NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων).

Υποβλήθηκαν σε εξέταση πέντε δείγματα σε διπλό αντίγραφο, σε πέντε επίπεδα στοιχείων εισόδου DNA από 250 ng έως 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng και 12 ng). Οκτώ δείγματα υποβλήθηκαν σε εξέταση ως μονό αντίγραφο σε κάθε ένα από τα πέντε επίπεδα στοιχείων εισόδου DNA. Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας, οι γονότυποι αναφοράς συγκρίθηκαν με τα Platinum Genomes έκδοση 2016-1.0. Ορίστηκαν αποτελέσματα για κάθε επίπεδο στοιχείων εισόδου. Το PPA για κάθε τύπο παραλλαγής (SNV, προσθήκες και διαγραφές) παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Το NPA παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Όλα τα επίπεδα στοιχείων εισόδου είχαν παρόμοια ακρίβεια. Τα συνιστώμενα στοιχεία εισόδου DNA για το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx είναι 50 ng με 25 ng και 100 ng και παρέχουν ένα κατώτερο και ένα ανώτερο όριο για να πληρούνται τα χαρακτηριστικά απόδοσης.

Πίνακας 1 Αποτελέσματα PPA για κάθε στοιχείο εισόδου DNA ανά τύπο παραλλαγής

Στοιχείο εισόδου DNA (ng)	Τύπος παραλλαγής	Αναμενόμενες παραλλαγές	TP	FN	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	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	Προσθήκη	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	Διαγραφή	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

Πίνακας 2 NPA για κάθε στοιχείο εισόδου DNA

Στοιχείο εισόδου DNA (ng)	TN	FP	Χωρίς αντιστοιχίσεις αναφοράς	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatic)

Το εύρος των στοιχείων εισόδου DNA που είναι μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) για την προετοιμασία βιβλιοθηκών TruSeq Custom Amplicon Kit Dx με τη ροή εργασιών της μονάδας Somatic Variant Module καθορίστηκε για το όργανο NextSeq 550Dx. Το εύρος των στοιχείων εισόδου DNA αξιολογήθηκε μέσω της εκτέλεσης μιας μελέτης εν σειρά αραιώσεων με τρία δείγματα Platinum Genome και με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι κυτταρικές σειρές Platinum Genome GM12878 και GM12877 έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμαλίνη, έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη και, κατόπιν, έχουν υποβληθεί σε εξαγωγή DNA. Το GM12878 αραιώθηκε με GM12877 έτσι ώστε οι συχνότητες αλληλόμορφων παραλλαγής (VAF) των 81 παραλλαγών (55 SNV, 10 προσθήκης και 16 διαγραφές) να είναι κοντά στο 0,025, 0,05 ή 0,10. Επιπλέον, κάθε δείγμα είχε 91 παραλλαγές με υψηλότερες συχνότητες παραλλαγής έως και 1,0 VAF. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σε διπλό αντίγραφο σε πέντε επίπεδα στοιχείων εισόδου DNA με μέσο ποσοτικό κύκλο δέλτα (dCq) 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 και 7,8 σύμφωνα με μετρήσεις με το TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Κάθε βιβλιοθήκη υποβλήθηκε σε αλληλούχιση σε δύο όργανα NextSeq 550Dx με δύο παρτίδες από NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων). Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας, οι αντιστοιχίσεις παραλλαγής του δείγματος συγκρίθηκαν με τα Platinum Genomes έκδοση 2016-1.0. Το PPA για κάθε τύπο παραλλαγής (SNV, προσθήκης και διαγραφές) παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Το NPA παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα συνιστώμενα στοιχεία εισόδου DNA για παραλλαγές με 0,05 VAF και άνω είναι dCq ≤ 4 με 4,6 ως το κατώτατο όριο για να πληρούνται τα χαρακτηριστικά της απόδοσης.

Πίνακας 3 Αποτελέσματα PPA για κάθε στοιχείο εισόδου DNA ανά τύπο παραλλαγής

Μέσο dCq	Τύπος παραλλαγής	Αναμενόμενες παραλλαγές	Αναμενόμενες μη αντιστοιχίσεις	VAF στοχευόμενης αραίωσης					
				0,025		0,05		0,10	
				Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	PPA (%)	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	PPA (%)	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	PPA (%)
2,1	SNV	808	Δεν ισχύει.	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	Προσθήκη	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	Διαγραφή	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

Πίνακας 4 NPA για κάθε στοιχείο εισόδου DNA

Μέσο dCq	Αναμενόμενος άγριος τύπος	VAF στοχευόμενης αραίωσης					
		0,025		0,05		0,10	
		Χωρίς αντιστοιχίσεις αναφοράς	NPA (%)	Χωρίς αντιστοιχίσεις αναφοράς	NPA (%)	Χωρίς αντιστοιχίσεις αναφοράς	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

Ευαισθησία της ανάλυσης (Όριο τυφλού [LoB] και όριο ανίχνευσης [LoD])

Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση των τιμών ορίου τυφλού (LoB) και ορίου ανίχνευσης (LoD) για τη μονάδα Somatic Variant Module στο όργανο NextSeq 550Dx. Η αξιολόγηση έγινε μέσω ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού ο οποίος έχει σχεδιαστεί να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι κυτταρικές σειρές Platinum Genome GM12878 και GM12877 έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμαλίνη, έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη και, κατόπιν, έχουν υποβληθεί σε εξαγωγή DNA. Το GM12878 αραιώθηκε με GM12877 έτσι ώστε οι συχνότητες παραλλαγής 74 παραλλαγών (53 SNV, 7 προσθήκες και 14 διαγραφές) να είναι 0,05 ± 0,02. Το GM12877 και το αραιωμένο GM12878 (GM12878-D) εξετάστηκαν έξι διαδοχικές ημέρες έναρξης με ένα όργανο, με εναλλαγή μεταξύ δύο παρτίδων NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων), για ένα σύνολο έξι εκτελέσεων αλληλούχισης. Αυτή η εξέταση προσέφερε 60 αντίγραφα για κάθε παραλλαγή GM12878-D και 72 αντίγραφα για κάθε αντίστοιχη συντεταγμένη άγριου τύπου στο GM12877 για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων. Οι τιμές LoB και LoD υπολογίστηκαν με την κλασική προσέγγιση που αναφέρεται στο

CLSI EP17-A2 με τη μη παραμετρική επιλογή. Οι τιμές LoB και LoD υπολογίστηκαν ξεχωριστά για SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω ομαδοποίησης των συχνοτήτων παραλλαγής για έναν συγκεκριμένο τύπο παραλλαγής. Το σφάλμα Τύπου I ορίστηκε ως 0,01 και το σφάλμα Τύπου II ορίστηκε ως 0,05.

Για την ομαδοποίηση LoB, οι ομαδοποιημένες συχνότητες παραλλαγής ταξινομήθηκαν από την κατώτερη στην ανώτερη, και υπολογίστηκε η 99η θέση για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων για κάθε τύπο παραλλαγής (Πίνακας 5). Η μονάδα Somatic Variant Module χρησιμοποιεί τιμή αποκοπής (ενεργό LoB) 0,026 VAF για τον καθορισμό της ποσοτικής ανίχνευσης παραλλαγών. Ο υπολογισμός της τιμής LoB επαλήθευσε ότι αυτή η τιμή αποκοπής έχει ως αποτέλεσμα σφάλμα Τύπου I που δεν υπερβαίνει το 0,01.

Πίνακας 5 Όριο τυφλού

Τύπος παραλλαγής	Συνολικές παρατηρήσεις	LoB για παρτίδα αντιδραστηρίων 1 (%)	LoB για παρτίδα αντιδραστηρίων 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Προσθήκη	504	0,56	0,56
Διαγραφή	1008	1,20	1,20

Για την τιμή LoD, υπολογίστηκε το ποσοστό των μεμονωμένων συχνοτήτων μεταλλάξεων για κάθε παρτίδα αντιδραστηρίων για κάθε τύπο παραλλαγής είναι μικρότερο από την τιμή αποκοπής 0,026 Πίνακας 6. Επειδή τα ποσοστά ήταν χαμηλότερα από το σφάλμα Τύπου II 5% (0,05), η διάμεσος των συνδυασμένων συχνοτήτων παραλλαγής υπολογίστηκε ως τιμή LoD (Πίνακας 6). Η τιμή LoD για κάθε τύπο παραλλαγής θεωρήθηκε η μεγαλύτερη των δύο τιμών που υπολογίστηκαν για τις δύο παρτίδες αντιδραστηρίων – 4,97% για SNV, 5,12% για προσθήκες και 5,26% για διαγραφές.

Πίνακας 6 Όριο ανίχνευσης

Παρτίδα αντιδραστηρίων	Τύπος παραλλαγής	Συνολικές παρατηρήσεις	Αριθμός μετρήσεων VAF < 2,6%	% μετρήσεων VAF < 2,6%	Όριο ανίχνευσης (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Προσθήκη	420	6	1,4	5,08
	Διαγραφή	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Προσθήκη	420	5	1,2	5,12
	Διαγραφή	840	7	0,80	5,26

Ορθότητα

Germline

Η παρακάτω μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ακρίβειας αντιστοίχισης παραλλαγής της μονάδας Germline Variant Module στο όργανο NextSeq 550Dx με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων). Υποβλήθηκαν σε εξέταση 13 μοναδικά δείγματα Platinum Genome κατά τη διάρκεια ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού σχεδιασμένου να αναζητά διάφορα γονίδια που καλύπτουν 12.588 βάσεις (150 αμπλικόνια) σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν εννέα εκτελέσεις με τρία όργανα αλληλούχισης, τρεις παρτίδες αντιδραστηρίων και τρεις χειριστές, σε πέντε ημέρες έναρξης. Η ακρίβεια ορίστηκε για SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με μια καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων, τη μέθοδο Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0. Οι περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης καθορίζονται βάσει αυτής της μεθόδου αναφοράς, εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά.

Πίνακας 7 Σύνοψη της συμφωνίας Germline

Κριτήριο	Συνολικές παρατηρήσεις ¹	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση ²	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση ³
PPA για SNV	819	98,7	>99,9
PPA για προσθήκες	819	95,0	98,9
PPA για διαγραφές	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Υπολογίζεται ως αριθμός δειγμάτων ανά εκτέλεση (91) επί τον αριθμό των εκτελέσεων (9) = 819.

²Κατώτερη τιμή που παρατηρήθηκε ανά αντίγραφο δείγματος και στις 9 εκτελέσεις.

³Κατώτερη τιμή όταν τα δεδομένα κάθε εκτέλεσης αναλύονται συγκεντρωτικά.

Ο Πίνακας 8 περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης με θετική και αρνητική συμφωνία ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με τα δεδομένα της μεθόδου Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0 για υπολογισμούς PPA. Οι τρεις τύποι παραλλαγών (SNV, προσθήκες και διαγραφές) συνδυάζονται. Επειδή η μέθοδος αναφοράς παρέχει αποτελέσματα μόνο για τις παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου και για προσθήκες/διαγραφές, τα αποτελέσματα βάσης χωρίς παραλλαγές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19 για υπολογισμούς NPA.

Πίνακας 8 Συμφωνία Germline ανά δείγμα

Δείγμα	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	Αναμενόμενες παραλλαγές ¹	TP	FN	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Συνολικός αριθμός παραλλαγών σε όλα τα αντίγραφα δειγμάτων και στις 9 εκτελέσεις.

Ο Πίνακας 9 περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με την καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων. Η ανίχνευση αξιολογείται για κάθε τύπο παραλλαγής –SNV, προσθήκες και διαγραφές– ξεχωριστά. Οι θέσεις αναφοράς εξαιρούνται.

Πίνακας 9 Συμφωνία Germline ανά δείγμα, ανά τύπο παραλλαγής

>Δείγμα	SNV			Προσθήκες			Διαγραφές		
	>Αναμενόμενο	>TP	>FN	>Αναμενόμενο	>TP	>FN	Αναμενόμενο	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση για την αντιστοίχιση μικρών προσθηκών και διαγραφών (indel). Μια συνολική σύνοψη είναι διαθέσιμη στον Πίνακας 10. Υπήρξαν συνολικά 71 indel τα οποία είχαν μέγεθος 1–24 bp για προσθήκες και 1–25 bp για διαγραφές.

Πίνακας 10 Σύνοψη ανίχνευσης indel Germline

Τύπος παραλλαγής	Αναμενόμενες παραλλαγές	TP	FN	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	PPA
Προσθήκη	18522	18018	27	477	99,9
Διαγραφή	17388	17073	0	315	100

Ο αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός περιελάμβανε 150 αμπλικόνια σχεδιασμένα να καλύπτουν ένα εκτεταμένο εύρος γονιδιωματικού περιεχομένου. Το περιεχόμενο GC των αμπλικονίων είχε εύρος 0,19–0,87. Τα αμπλικόνια είχαν, επίσης, εύρος επαναλήψεων ενός νουκλεοτιδίου (π.χ., PolyA, PolyT), δινουκλεοτιδίων και τρινουκλεοτιδίων. Τα δεδομένα συγκεντρώθηκαν ανά αμπλικόνιο (Πίνακας 11) για να καθοριστεί η επίδραση του γονιδιωματικού περιεχομένου στο ποσοστό των σωστών αντιστοιχίσεων. Το ποσοστό των σωστών αντιστοιχίσεων αποτελείται από τις αντιστοιχίσεις παραλλαγής και αναφοράς και είναι μικρότερο από 100% αν υπάρχουν είτε εσφαλμένες αντιστοιχίσεις είτε μη αντιστοιχίσεις.

Πίνακας 11 Ακρίβεια Germline σε επίπεδο αμπλικονίων

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Δ/Ι	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
18	3	46620561	46620643	83	83	Δ/Ι	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	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Δ/Ι	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Δ/Ι	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Δ/Ι	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Δ/Ι	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Δ/Ι	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Δ/Ι	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Δ/Ι	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Δ/Ι	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Δ/Ι	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Δ/Ι	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Δ/Ι	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Δ/Ι	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Δ/Ι	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Δ/Ι	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Δ/Ι	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Δ/Ι	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Δ/Ι	0,55	0	0	0	Δ/Ι
149	Y	2655519	2655609	91	0	Δ/Ι	0,48	0	0	0	Δ/Ι
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Δ/Ι

Τα αποτελέσματα αλληλούχισης για το δείγμα NA12878 συγκρίθηκαν με έναν γονότυπο με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης για το NA12878, ο οποίος έχει οριστεί από το National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Από τα 150 αμπλικόνια, 92 αμπλικόνια περιείχονταν πλήρως στις περιοχές υψηλής εμπιστοσύνης του γονιδιώματος, 41 αμπλικόνια ήταν μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενα και 17 αμπλικόνια δεν αλληλεπικαλύπτονταν στην αλληλουχία NIST. Αυτό το αποτέλεσμα απέφερε 10.000 συντεταγμένες ανά αντίγραφο για σύγκριση. Αντιστοιχίσεις βάσης μη παραλλαγής συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19. Τα αποτελέσματα ακρίβειας αναφέρονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12 Συμφωνία βλαστικής σειράς δείγματος NA12878 με τη βάση δεδομένων NIST

Δείγμα	Αριθμός αμπλικονίων	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Βάσει των δεδομένων που προέρχονται από αυτήν τη μελέτη βλαστικής σειράς εννέα εκτελέσεων, το όργανο NextSeq 550Dx μπορεί να υποβάλει σε αλληλούχιση με συνέπεια:

- ▶ Περιεχόμενο GC \geq 19% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 19% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,6%)
- ▶ Περιεχόμενο GC \leq 87% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 87% αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσης)
- ▶ Μήκη PolyA \leq 9 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyA εννέα νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσης)
- ▶ Μήκη PolyT \leq 10 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyT δέκα νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσης)
- ▶ Μήκη PolyG \leq 7 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyG επτά νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 1,0%)
- ▶ Μήκη PolyC \leq 6 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 2457 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyC έξι νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσης)
- ▶ Μήκη επανάληψης δινουκλεοτιδίων \leq 11x (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη δινουκλεοτιδίων 11x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,5%)
- ▶ Μήκη επανάληψης τρινουκλεοτιδίων \leq 5x (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη τριδινουκλεοτιδίων 5x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,5%)
- ▶ Μήκη προσθήκης \leq 24 (66343 από 66370 αντιστοιχισμένες βάσεις σε 819 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν προσθήκη 24 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 1,2%, δεν παρουσιάστηκαν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις σε περιοχή με προσθήκη 24 νουκλεοτιδίων)
- ▶ Μήκη διαγραφής \leq 25 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 2457 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν διαγραφή 25 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με μηδενικό ποσοστό μη αντιστοιχίσεων)

Somatic

Η μελέτη που περιγράφεται εδώ πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ακρίβειας αντιστοιχίσης παραλλαγής στη μονάδα Somatic Variant Module με το όργανο NextSeq 550Dx και το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων).

Σε αυτήν τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός για την αναζήτηση πληθώρας γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις (150 αμπλικόνια) σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα. Το Platinum Genome DNA εξήχθη από μπλοκ που είχαν υποβληθεί σε επεξεργασία FFPE, για τη δημιουργία έξι μοναδικών δειγμάτων για αξιολόγηση στο πλαίσιο της μελέτης.

Το δείγμα GM12877 DNA αραιώθηκε με δείγμα DNA GM12878 για τη δημιουργία των GM12877-D5 και GM12877-D7 ως ένα σύνολο μοναδικών ετερόζυγων παραλλαγών με συχνότητες παραλλαγής κοντά στο 5% και στο 7%. Παρομοίως, το δείγμα DNA GM12878 αραιώθηκε με δείγμα DNA GM12877 για τη δημιουργία των GM12878-D5 και GM12878-D7. Κάθε δείγμα υποβλήθηκε σε εξέταση σε τρία αντίγραφα, με εξαίρεση τα αραιωμένα δείγματα, τα οποία υποβλήθηκαν σε εξέταση σε έξι αντίγραφα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν εννέα εκτελέσεις με τρία όργανα αλληλούχισης, τρεις παρτίδες αντιδραστηρίων και τρεις χειριστές, σε πέντε ημέρες έναρξης. Η ακρίβεια ορίστηκε για

SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με μια καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων, τη μέθοδο Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0. Οι γονιδιωματικές περιοχές με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης καθορίζονται βάσει αυτής της μεθόδου αναφοράς, εκτός και αν ορίζεται διαφορετικά.

Πίνακας 13 Σύνοψη συμφωνίας Somatic

Κριτήρια	Συνολικές παρατηρήσεις ¹	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση ²	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση ³
PPA για SNV	378	98,9	99,9
PPA για προσθήκες	378	96,9	99,9
PPA για διαγραφές	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Υπολογίζεται ως αριθμός δειγμάτων ανά εκτέλεση (42) επί τον αριθμό των εκτελέσεων (9) = 378.

²Κατώτερη τιμή που παρατηρήθηκε ανά αντίγραφο δείγματος και στις 9 εκτελέσεις.

³Κατώτερη τιμή όταν τα δεδομένα κάθε εκτέλεσης αναλύονται συγκεντρωτικά.

Ο Πίνακας 14 περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης με θετική και αρνητική συμφωνία ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με την καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων για υπολογισμούς PPA. Οι τρεις τύποι παραλλαγών (SNV, προσθήκες και διαγραφές) συνδυάζονται. Επειδή η μέθοδος αναφοράς παρέχει αποτελέσματα μόνο για τις παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου και για προσθήκες/διαγραφές, τα αποτελέσματα βάσης χωρίς παραλλαγές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19 για υπολογισμούς NPA.

Πίνακας 14 Συμφωνία Somatic ανά δείγμα

Δείγμα	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίας	Αναμενόμενο	TP	FN	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

Ο Πίνακας 15 περιλαμβάνει τα δεδομένα της μελέτης ανά δείγμα, όπου τα αποτελέσματα των παραλλαγών συγκρίνονται με την καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων. Η ανίχνευση αξιολογείται για κάθε τύπο παραλλαγής – SNV, προσθήκες και διαγραφές– ξεχωριστά. Οι θέσεις αναφοράς εξαιρούνται.

Πίνακας 15 Συμφωνία Somatic ανά δείγμα ανά τύπο παραλλαγής

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

Τα δέκα δείγματα αναλύθηκαν περαιτέρω για την αντιστοίχιση μικρών προσθηκών και διαγραφών (indel) (Πίνακας 16). Υπήρξαν συνολικά 71 indel τα οποία είχαν μέγεθος 1–24 bp για προσθήκες και 1–25 bp για διαγραφές.

Πίνακας 16 Σύνοψη ανίχνευσης indel για τη μονάδα Somatic

Τύπος παραλλαγής	Αναμενόμενες παραλλαγές	TP	FN	Μη αντιστοιχίσεις παραλλαγής	PPA
Προσθήκη	10773	10282	9	482	99,2
Διαγραφή	11502	10667	5	830	>99,9

Τα 150 αμπλικόνια σχεδιάστηκαν ώστε να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος γονιδιωματικού περιεχομένου. Το περιεχόμενο GC των αμπλικονίων είχε εύρος 0,19–0,87. Τα αμπλικόνια είχαν, επίσης, εύρος επαναλήψεων ενός νουκλεοτιδίου (π.χ., PolyA, PolyT), δινουκλεοτιδίων και τρινουκλεοτιδίων. Τα δεδομένα συγκεντρώθηκαν ανά αμπλικόνιο (Πίνακας 17) για να καθοριστεί η επίδραση του γονιδιωματικού περιεχομένου στο ποσοστό των σωστών αντιστοιχίσεων. Το ποσοστό των σωστών αντιστοιχίσεων αποτελείται από τις αντιστοιχίσεις παραλλαγής και αναφοράς και είναι μικρότερο από 100% αν υπάρχουν είτε εσφαλμένες αντιστοιχίσεις είτε μη αντιστοιχίσεις.

Πίνακας 17 Ακρίβεια μονάδας Somatic σε επίπεδο αμπλικονίων

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA(3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Δ/I	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Δ/I	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Δ/Ι	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Δ/Ι	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Δ/Ι	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Δ/Ι	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
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	Δ/Ι	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Δ/Ι	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Δ/Ι	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	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Δ/Ι	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Δ/Ι	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Δ/Ι	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
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	Δ/Ι	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Δ/Ι	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	Δ/Ι	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Δ/I	0,37	34386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Δ/I	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Δ/I	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Δ/I	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Δ/I	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Δ/I	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9

Αμπλικόνιο	Χρωμόσωμα	Αρχή αμπλικονίου	Τέλος αμπλικονίου	Μέγεθος τμήματος που υποβλήθηκε σε ανάλυση	Βάσεις στις περιοχές υψηλού επιπέδου εμπιστοσύνης	Γονιδιωματικό περιεχόμενο αμπλικονίου	Περιεχόμενο GC	Σωστές αντιστοιχίσεις	Εσφαλμένες αντιστοιχίσεις	Μη αντιστοιχίσεις	% σωστών αντιστοιχίσεων
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Δ/I	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	Δ/I	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Δ/I	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Δ/I	0,55	0	0	0	Δ/I
149	Y	2655519	2655609	91	0	Δ/I	0,48	0	0	0	Δ/I
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Δ/I

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για το δείγμα GM12878 συγκρίθηκαν με έναν γονότυπο με υψηλό επίπεδο εμπιστοσύνης για το NA12878, ο οποίος έχει οριστεί από το National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Από τα 150 αμπλικόνια, 92 αμπλικόνια περιείχονταν πλήρως στις περιοχές υψηλής εμπιστοσύνης του γονιδιώματος, 41 αμπλικόνια ήταν μερικώς αλληλεπικαλυπτόμενα και 17 αμπλικόνια δεν αλληλεπικαλύπτονταν στην αλληλουχία NIST. Αυτό το αποτέλεσμα απέφερε 10.000 συντεταγμένες ανά αντίγραφο για σύγκριση. Αντιστοιχίσεις βάσης μη παραλλαγής συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος hg19. Τα αποτελέσματα ακρίβειας αναφέρονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18 Συμφωνία Somatic για το δείγμα GM12878 με βάση τη δεδομένων του NIST

Δείγμα	Αριθμός αμπλικονίων	Μέσο ποσοστό αντιστοιχίσης	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Βάσει των δεδομένων από τη σωματική μελέτη εννέα εκτελέσεων, το όργανο NextSeq 550Dx μπορεί να υποβάλει σε αλληλούχιση τα εξής:

- ▶ Περιεχόμενο GC \geq 19% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 19% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 2,6%)
- ▶ Περιεχόμενο GC \leq 87% (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης με περιεχόμενο GC 87% αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,6%)
- ▶ Μήκη PolyA \leq 9 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyA εννέα νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 2,5%)
- ▶ Μήκη PolyT \leq 10 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyT δέκα νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης χαμηλότερο από 0,1%)
- ▶ Μήκη PolyG \leq 6 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 2268 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyG έξι νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,5%)
- ▶ Μήκη PolyC \leq 6 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 756 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη PolyC έξι νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,4%)
- ▶ Μήκη επανάληψης δινουκλεοτιδίων \leq 4x (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 1890 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη δινουκλεοτιδίων 4x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,9%)
- ▶ Μήκη επανάληψης τρινουκλεοτιδίων \leq 5x (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη τρινουκλεοτιδίων 5x αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 1,4%)
- ▶ Μήκη PolyA \leq 23 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 378 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν επανάληψη προσθήκης 23 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,8%)
- ▶ Μήκη διαγραφής \leq 25 (όλες οι αντιστοιχισμένες βάσεις σε 1134 αμπλικόνια αλληλούχισης που περιέχουν διαγραφή 25 νουκλεοτιδίων αντιστοιχίστηκαν σωστά με ποσοστό μη αντιστοιχίσης 0,7%)

Ακρίβεια

Η ακρίβεια του οργάνου NextSeq 550Dx ορίστηκε μέσω εξέτασης 13 μοναδικών δειγμάτων Platinum Genome με τρία όργανα, τρεις παρτίδες αντιδραστηρίων και τρεις χειριστές, για τη δημιουργία εννέα εκτελέσεων αλληλούχισης σε πέντε ημέρες έναρξης. Ο αντιπροσωπευτικός προσδιορισμός, τα δείγματα και η μέθοδος αναφοράς είναι όμοια με όσα περιγράφονται για τη μελέτη ακρίβειας βλαστικής σειράς. Οι συνεισφορές ακρίβειας ορίστηκαν μέσω ανάλυσης στοιχείων μεταβλητότητας λαμβάνοντας την τιμή VAF ως τη μεταβλητή απόκρισης και υπολογίζοντας τις τυπικές αποκλίσεις σε επίπεδο στοιχείου για το όργανο, την παρτίδα αντιδραστηρίων, τον χειριστή και την ημέρα έναρξης (Πίνακας 19). Ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της μεταβλητότητας για κάθε στοιχείο του οργάνου, για τον χειριστή ή την παρτίδα των αντιδραστηρίων, ήταν 699, 176 και 235 για SNV, προσθήκες και διαγραφές, αντίστοιχα.

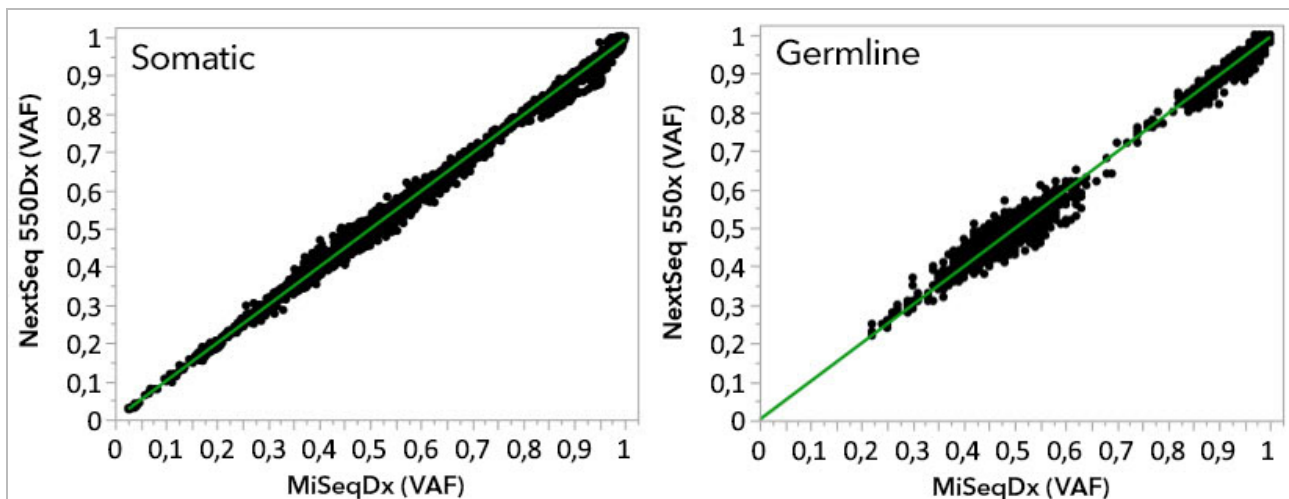
Πίνακας 19 Αποτελέσματα ακρίβειας για το όργανο NextSeq 550Dx (Τυπική απόκλιση)

Στοιχείο	Τύπος παραλλαγής	Τυπική απόκλιση στοιχείου		Συνολική τυπική απόκλιση	
		Μέγ.	Διάμεσος	Μέγ.	Διάμεσος
Παρτίδα	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Προσθήκη	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Διαγραφή	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Όργανο	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Προσθήκη	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Διαγραφή	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Χειριστής	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Προσθήκη	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Διαγραφή	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Ημέρα	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Προσθήκη	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Διαγραφή	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Σύγκριση μεθόδων (Πλατφόρμα αλληλούχισης)

Ολικό αίμα και δείγματα FFPE αξιολογήθηκαν στο όργανο NextSeq 550Dx και στο όργανο MiSeqDx χρησιμοποιώντας τις ροές εργασιών βλαστικής σειράς και σωματικών παραλλαγών με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Η συμφωνία συχνότητας παραλλαγής για δείγματα αίματος και δείγματα FFPE αξιολογήθηκε μέσω περισσότερων αντιπροσωπευτικών προσδιορισμών. Στο **Εικόνα 2** αποτυπώνεται η συσχέτιση VAF μεταξύ των δύο οργάνων για έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό και στον **Πίνακα 20** αναγράφεται μια σύνοψη αυτής της συσχέτισης μέσω πίνακα προσδιορισμού. Βάσει της ισχυρής συσχέτισης μεταξύ του οργάνου MiSeqDx και του οργάνου NextSeq 550Dx, τα χαρακτηριστικά απόδοσης που σχετίζονται με παράγοντες προ της ανάλυσης (π.χ., μέθοδοι εξαγωγής ή παρεμβαλλόμενες ουσίες) ισχύουν και για τα δύο όργανα. Δείτε το ένθετο συσκευασίας TruSeq Custom Amplicon Kit Dx για περισσότερες λεπτομέρειες.

Εικόνα 2 Συσχέτιση VAF MiSeqDx με τα όργανα NextSeq 550Dx για δείγματα FFPE (στα αριστερά) και δείγματα αίματος (στα δεξιά) με τον Προσδιορισμό 1



Πίνακας 20 Αποτελέσματα σύγκρισης μεθόδων με μοναδικά δείγματα αίματος και δείγματα FFPE

Προέλευση gDNA	Προσδιορισμός (Πίνακας ολιγονουκλεοτιδίων)	Βιολογικά αντίγραφα (Δείγματα)	Τεχνικά αντίγραφα (ανά δείγμα)	Παρατηρήσεις (Αριθμός παραλλαγών)	Κλίση	Σημείο τομής	Συσχέτιση (R ²)
Αίμα	Προσδιορισμός 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Αίμα	Προσδιορισμός 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Προσδιορισμός 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Προσδιορισμός 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Δύο σημεία δεδομένων καταργήθηκαν βάσει του περιορισμού που αναφέρεται στη μονάδα Germline Variant Module.

²Συντελεστής καθορισμού για τα γραφήματα VAF όπως αποτυπώνονται στην Εικόνα 2.

Αναπαραγωγικότητα

Η αναπαραγωγικότητα του οργάνου NextSeq 550Dx αξιολογήθηκε με δείγματα Platinum Genome και με έναν αντιπροσωπευτικό προσδιορισμό σχεδιασμένο να αναζητά πληθώρα γονιδίων που καλύπτουν 12.588 βάσεις σε 23 διαφορετικά χρωμοσώματα με 150 αμπλικόνια. Η εξέταση βλαστικής σειράς αποτελούνταν από επτά αντίγραφα 13 δειγμάτων, ενώ η σωματική ανάλυση αποτελούνταν από έξι αντίγραφα επτά δειγμάτων σε διαφορετικά επίπεδα VAF. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Η εξέταση έλαβε χώρα σε τρεις εξωτερικές εγκαταστάσεις με μία παρτίδα NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων). Σε κάθε εγκατάσταση χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο NextSeq 550Dx. Σε κάθε εγκατάσταση η εξέταση πραγματοποιήθηκε από δύο χειριστές. Κάθε χειριστής πραγματοποίησε την εξέταση τρεις διαδοχικές ημέρες έναρξης για κάθε τύπο δείγματος, για ένα σύνολο 36 εκτελέσεων και στις τρεις εγκαταστάσεις. Αυτή η εξέταση είχε ως αποτέλεσμα 18 εκτελέσεις για κάθε ροή εργασιών βλαστικής σειράς και σωματικής ανάλυσης.

Germline

Οι παραλλαγές βλαστικής σειράς με επίπεδο VAF $\geq 0,2$ αναφέρονται ως θετικές (παραλλαγή). Για αναμενόμενες θετικές παραλλαγές βλαστικής σειράς, τα δεδομένα αξιολογήθηκαν ως προς το ποσοστό μη αντιστοιχίσεων και το ποσοστό σωστών θετικών αντιστοιχίσεων σε κάθε τύπο παραλλαγής (SNV, προσθήκη, διαγραφή). Ο Πίνακας 21 συνοψίζει τα ποσοστά που παρατηρήθηκαν, μαζί με το κατώτερο και το ανώτερο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (LCL/UCL) που υπολογίζονται με τη μέθοδο Wilson Score, για κάθε τύπο παραλλαγής.

Πίνακας 21 Παρατηρήσεις αντιστοιχίσης βλαστικής σειράς για αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα ανά τύπο παραλλαγής

Τύπος παραλλαγής	Μη αντιστοιχίση			Σωστή θετική αντιστοιχίση				
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Προσθήκες	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Διαγραφές	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Οι παραλλαγές βλαστικής σειράς με επίπεδο VAF $< 0,2$ αναφέρονται ως αρνητικές (άγριος τύπος). Για τις αναμενόμενες αρνητικές θέσεις βλαστικής σειράς, τα δεδομένα αξιολογήθηκαν ως προς το ποσοστό μη αντιστοιχίσης και το ποσοστό σωστής αντιστοιχίσης άγριου τύπου. Ο Πίνακας 22 συνοψίζει τα ποσοστά που παρατηρήθηκαν, μαζί με το κατώτερο και το ανώτερο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (LCL/UCL) που υπολογίζονται με τη μέθοδο Wilson Score.

Πίνακας 22 Παρατηρήσεις αντιστοιχίσης βλαστικής σειράς για αναμενόμενα αρνητικά αποτελέσματα

Τύπος παραλλαγής	Μη αντιστοιχίση			Σωστή αρνητική αντιστοιχίση				
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
Άγριος τύπος	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Οι παραλλαγές βλαστικής σειράς με επίπεδο VAF $\geq 0,2$ και $< 0,7$ αντιστοιχίζονται ως θετικές ετερόζυγες για την παραλλαγή και οι παραλλαγές με επίπεδο VAF $\geq 0,7$ αντιστοιχίζονται ως θετικές ομόζυγες για την παραλλαγή. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με ετερόζυγες παραλλαγές για να καθοριστεί το κατά πόσον η εγγενής μεταβλητότητα του προσδιορισμού μπορεί να επηρεάσει την αντιστοίχιση του γονότυπου. Το Cx ορίστηκε και για τις δύο τιμές αποκοπής (0,2 για ετερόζυγους και 0,7 για ομόζυγους γονότυπους), όπου x είναι το ποσοστό των επαναλαμβανόμενων εξετάσεων που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής. Για την κατώτερη τιμή αποκοπής 0,2 VAF, το Cx ήταν $\geq 99,999\%$, υποδεικνύοντας ότι $\geq 99,999\%$ των ετερόζυγων παραλλαγών θα αντιστοιχίζονταν ως ετερόζυγες. Λαμβάνοντας υπόψη την ανώτερη τιμή αποκοπής 0,7 VAF, το Cx ήταν $\leq 0,001\%$ υποδεικνύοντας, έτσι, ότι $\leq 0,001\%$ των ετερόζυγων παραλλαγών θα αντιστοιχίζονταν ως ομόζυγες. Ο Πίνακας 23 συνοψίζει τα αποτελέσματα ανά τύπο μεταβλητής.

Οι παραλλαγές βλαστικής σειράς με επίπεδο VAF $\geq 0,2$ και $< 0,7$ αντιστοιχίζονται ως θετικές ετερόζυγες για την παραλλαγή και οι παραλλαγές με επίπεδο VAF $\geq 0,7$ αντιστοιχίζονται ως θετικές ομόζυγες για την παραλλαγή. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με ετερόζυγες παραλλαγές για να καθοριστεί το κατά πόσον η εγγενής μεταβλητότητα του προσδιορισμού μπορεί να επηρεάσει την αντιστοίχιση του γονότυπου. Το Cx ορίστηκε και για τις δύο τιμές αποκοπής (0,2 για ετερόζυγους και 0,7 για ομόζυγους γονότυπους), όπου x είναι το ποσοστό των επαναλαμβανόμενων εξετάσεων που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής. Για την κατώτερη τιμή αποκοπής 0,2 VAF, το Cx ήταν $\geq 99,999\%$, υποδεικνύοντας ότι $\geq 99,999\%$ των ετερόζυγων παραλλαγών θα αντιστοιχίζονταν ως ετερόζυγες. Για την ανώτερη τιμή αποκοπής 0,7 VAF, το Cx ήταν $\leq 0,001\%$ υποδεικνύοντας, έτσι, ότι $\leq 0,001\%$ των ετερόζυγων παραλλαγών θα αντιστοιχίζονταν ως ομόζυγες. Ο Πίνακας 23 συνοψίζει τα αποτελέσματα ανά τύπο μεταβλητής.

Πίνακας 23 Τιμές Cx βλαστικής σειράς για ετερόζυγες παραλλαγές

Τύπος παραλλαγής	Τιμή αποκοπής 0,2 VAF	Τιμή αποκοπής 0,7 VAF
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Προσθήκες	24/24	24/24
Διαγραφές	35/35	35/35
Σύνολο	153	153

Somatic

Οι σωματικές παραλλαγές με επίπεδα VAF $\geq 0,026$ αναφέρονται ως θετικές (παραλλαγή). Οι παρατηρήσεις με επίπεδα VAF $\geq 0,01$ και $< 0,026$ θεωρήθηκαν ασαφείς για τους σκοπούς αυτής της ανάλυσης (ούτε θετικές ούτε αρνητικές, επισημάνθηκαν ως παραλλαγές χαμηλής συχνότητας παραλλαγής). Για την αξιολόγηση της απόδοσης, τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν με τρεις τρόπους:

- ▶ Ευνοϊκότερη υπόθεση: Κάθε ασαφές αποτέλεσμα θεωρήθηκε σωστή θετική αντιστοίχιση (συμφωνία με τα αναμενόμενα αποτελέσματα)
- ▶ Δυσμενέστερη υπόθεση: Κάθε ασαφές αποτέλεσμα θεωρήθηκε εσφαλμένη αντιστοίχιση (ασυμφωνία με τα αναμενόμενα αποτελέσματα)
- ▶ Υπόθεση αποκλεισμού: Κάθε ασαφές αποτέλεσμα αποκλείστηκε από την ανάλυση

Τρεις πίνακες, ο Πίνακας 24, ο Πίνακας 25, και ο Πίνακας 26, συνοψίζουν τα αποτελέσματα της αντιστοίχισης για την ευνοϊκότερη υπόθεση, τη δυσμενέστερη υπόθεση και την υπόθεση αποκλεισμού αντίστοιχα, μαζί με το κατώτερο και το ανώτερο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (LCL/UCL) που υπολογίζονται με τη μέθοδο Wilson Score.

Πίνακας 24 Παρατηρήσεις σωματικών αντιστοιχίσεων για αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα ανά τύπο παραλλαγής (ευνοϊκότερη υπόθεση)

Τύπος παραλλαγής	Σωστή θετική αντιστοίχιση				
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Προσθήκες	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Διαγραφές	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Πίνακας 25 Παρατηρήσεις σωματικών αντιστοιχίσεων για αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα ανά τύπο παραλλαγής (δυσμενέστερη υπόθεση)

Τύπος παραλλαγής	Σωστή θετική αντιστοίχιση				
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Προσθήκες	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Διαγραφές	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Πίνακας 26 Παρατηρήσεις σωματικών αντιστοιχίσεων για αναμενόμενα θετικά αποτελέσματα ανά τύπο παραλλαγής (Κατάργηση ασαφών αντιστοιχίσεων)

Τύπος παραλλαγής	Σωστή θετική αντιστοίχιση				
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Προσθήκες	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Διαγραφές	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Οι σωματικές παραλλαγές με επίπεδο VAF < 0,01 αναφέρονται ως αρνητικές αντιστοιχίσεις (άγριος τύπος). Για τις αναμενόμενες αρνητικές σωματικές θέσεις, τα δεδομένα αξιολογήθηκαν ως προς το ποσοστό μη αντιστοίχισης και το ποσοστό σωστής αντιστοίχισης άγριου τύπου. Οι σωστές αντιστοιχίσεις άγριου τύπου ορίστηκαν εξαιρώντας τις μη αντιστοιχίσεις και αφαιρώντας από το σύνολο τις αντιστοιχίσεις που παρατηρήθηκαν και ανήκαν στη ζώνη ασάφειας (επίπεδα VAF ≥ 0,01 και < 0,026), αλλά και τις εσφαλμένες αντιστοιχίσεις που υπερέβαιναν την τιμή αποκοπής (επίπεδα VAF ≥ 0,026). Ο Πίνακας 27 συνοψίζει τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν, τα συνολικά αποτελέσματα και τα αποτελέσματα ποσοστών για αρνητικές σωματικές θέσεις για το ποσοστό μη αντιστοίχισης και το ποσοστό σωστής αντιστοίχισης άγριου τύπου, μαζί με το κατώτερο και το ανώτερο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (LCL/UCL) που υπολογίζονται με τη μέθοδο Wilson Score.

Πίνακας 27 Παρατηρήσεις σωματικής αντιστοίχισης για αναμενόμενα αρνητικά αποτελέσματα

Τύπος παραλλαγής	Μη αντιστοίχιση			Σωστή αντιστοίχιση						
	Παρατηρήθηκαν	Σύνολο	Ποσοστό	Ασαφής	Εσφαλμένες	Σωστή	Σύνολο	Ποσοστό	95% LCL	95% UCL
Άγριος τύπος	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Αξιολογήθηκαν σωματικά δείγματα σε διαφορετικά επίπεδα VAF για την ίδια παραλλαγή, για τον καθορισμό του C95 του προσδιορισμού (εντός κάθε τύπου παραλλαγής). Για την αξιολόγηση της μεταβλητότητας κοντά στην τιμή αποκοπής του προσδιορισμού, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με αναμενόμενα επίπεδα VAF μεταξύ 0,02 και 0,07. Το C95 ορίστηκε για κάθε παραλλαγή, με το υψηλότερο C95 για κάθε τύπο παραλλαγής να αναφέρεται στον Πίνακα 28.

Πίνακας 28 Σύνοψη C95 για σωματικές παραλλαγές

Τύπος παραλλαγής	N	C95
SNV	74	0,0613
Προσθήκη	24	0,0573
Διαγραφή	33	0,0575

Απόδοση του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων)

Επισκόπηση

Το NextSeq 550Dx υποστηρίζεται από δύο κιτ αντιδραστηρίων: το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Για να καταδειχθεί ότι το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) πληροί τις απαιτήσεις απόδοσης ανάλυσης που έχουν επαληθευτεί και τεκμηριωθεί με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων), πραγματοποιήθηκαν μελέτες με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Πραγματοποιήθηκαν δύο διαδικασίες προετοιμασίας βιβλιοθήκης με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, η μία με τη ροή εργασιών Germline και η άλλη με τη ροή εργασιών Somatic. Βιβλιοθήκες από κάθε ροή εργασίας υποβλήθηκαν σε εξέταση με τρεις πατρίδες από το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) με τρία όργανα NextSeq 550Dx. Επιπλέον, η εξέταση για κάθε ροή εργασιών περιελάμβανε μία εκτέλεση με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων).

Ευαισθησία της ανάλυσης (Όριο τυφλού [LoB] και όριο ανίχνευσης [LoD])

Η επαλήθευση με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) κατέδειξε ότι το όργανο NextSeq 550Dx μπορεί να ανιχνεύσει παραλλαγές σε 0,05 VAF με σφάλμα Τύπου II $\leq 0,05$ και ότι η τιμή αποκοπής 0,026 VAF που χρησιμοποιείται από τη μονάδα Somatic Variant Module (ενεργό LoB) υποστηρίζει σφάλμα Τύπου I $\leq 0,01$. Βάσει των παραπάνω ισχυρισμών, αναμένεται ότι μια παραλλαγή σε 0,05 VAF είναι μεγαλύτερη από ή ίση με 0,026 VAF στο 95% των περιπτώσεων και ότι μια θέση άγριου τύπου είναι μικρότερη από 0,026 VAF στο 99% των περιπτώσεων. Για να διασφαλιστεί ότι αυτοί οι ισχυρισμοί πληρούνται με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων), πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο όργανο NextSeq 550Dx με δείγματα άγριου τύπου (δείγματα LoB) και με δείγματα που περιελάμβαναν παραλλαγές σε 0,05 VAF (δείγματα LoD) με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Η αναλογία των αντιστοιχίσεων πάνω και κάτω από την τιμή αποκοπής 0,026 συγκρίθηκαν, στη συνέχεια, με τους ισχυρισμούς που καθορίστηκαν με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων).

Στην εξέταση συμπεριελήφθησαν δύο δείγματα LoD, κάθε ένα με ένα μοναδικό σετ παραλλαγών με στόχο μια τιμή 0,05 VAF και αντίστοιχα δείγματα LoB άγριου τύπου για τις στοχευόμενες παραλλαγές. Για την προετοιμασία βιβλιοθηκών, υποβλήθηκαν σε επεξεργασία δείγματα LoD και LoB σε αντίγραφα των οκτώ και των επτά, αντίστοιχα, με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Αρχικά, οι βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) για την αναγνώριση παραλλαγών/γονιδιωματικών συντεταγμένων για αξιολόγηση LoB/LoD με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Όλες οι παραλλαγές με μέση VAF 0,045 – 0,055 (παραλλαγές LoD) βάσει των αποτελεσμάτων από το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση LoD (N = 51 παραλλαγές). Για ανάλυση LoB, αξιολογήθηκαν οι 51 αντίστοιχες γονιδιωματικές συντεταγμένες.

Για την αξιολόγηση του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων), υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση βιβλιοθήκες σε τρεις εκτελέσεις, σε τρεις διαδοχικές ημέρες, χρησιμοποιώντας το ίδιο όργανο και κιτ αντιδραστηρίων από την ίδια παρτίδα. Η εξέταση αυτή είχε ως αποτέλεσμα 24 αντίγραφα για κάθε μία από τις 51 παραλλαγές LoD και 21 αντίγραφα για κάθε μία από τις αντίστοιχες θέσεις άγριου τύπου. Η αναλογία των αντιστοιχίσεων άγριου τύπου με VAF < 0,026 αναφέρεται στον Πίνακα 29. Η αναλογία αντιστοιχίσεων παραλλαγών LoD με VAF μεγαλύτερη από ή ίση με 0,026 αναφέρεται στον Πίνακα 30.

Πίνακας 29 Αναλογία αντιστοιχίσεων < 0,026 για θέσεις άγριου τύπου (Αξιολόγηση ισχυρισμών LoB)

Τύπος παραλλαγής	Θέσεις που αξιολογήθηκαν	Συνολικές παρατηρήσεις	Αριθμός μετρήσεων VAF $\geq 2,6\%$	Αναλογία < 2,6%	Αναλογία 95% Διάστημα εμπιστοσύνης
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Προσθήκη	11	231	0	1	0,984 – 1
Διαγραφή	8	168	0	1	0,978 – 1

Πίνακας 30 Αναλογία αντιστοιχίσεων $\geq 0,026$ VAF για παραλλαγές LoD (Αξιολόγηση ισχυρισμών LoD)

Τύπος παραλλαγής	Θέσεις που αξιολογήθηκαν	Συνολικές παρατηρήσεις	Αριθμός μετρήσεων VAF < 2,6%	Αριθμός μετρήσεων VAF $\geq 2,6\%$	Αναλογία $\geq 2,6\%$	Αναλογία 95% Διάστημα εμπιστοσύνης
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Προσθήκη	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Διαγραφή	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Ορθότητα

Germline

Η παρακάτω μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ακρίβειας αντιστοίχισης παραλλαγής στη μονάδα Germline Variant Module με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Υποβλήθηκαν σε εξέταση δώδεκα μοναδικά δείγματα Platinum Genome μέσω ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού.

Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 11 εκτελέσεις με τρία όργανα NextSeq 550Dx και τρία NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).

Η ακρίβεια ορίστηκε για SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με μια καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων, τη μέθοδο Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0. Τα αποτελέσματα ακρίβειας από μία εκτέλεση αλληλούχισης με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) παρέχονται ως αναφορά. Στον Πίνακα 31 αναγράφεται μια σύνοψη των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 31 Σύνοψη της συμφωνίας Germline

Κριτήρια	Συνολικές παρατηρήσεις (v2.5) ¹	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση (v2.5) ²	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση (v2) ³	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση (v2.5) ⁴	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση (v2) ⁴
PPA για SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA για προσθήκες	1056	100	100	100	98,9
PPA για διαγραφές	1056	95,2	95,2	>99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹ Υπολογίζεται ως αριθμός δειγμάτων ανά εκτέλεση επί τον αριθμό των εκτελέσεων (96 δείγματα ανά εκτέλεση επί 11 εκτελέσεις = 1056 παρατηρήσεις).

² Κατώτερη τιμή που παρατηρήθηκε ανά αντίγραφο δείγματος σε όλες τις εκτελέσεις (βάσει 11 εκτελέσεων για το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³ Κατώτερη τιμή ανά αντίγραφο δείγματος σε 1 εκτέλεση (96 συνολικές παρατηρήσεις).

⁴ Κατώτερη τιμή όταν τα δεδομένα κάθε εκτέλεσης αναλύονται συγκεντρωτικά.

Somatic

Η παρακάτω μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ακρίβειας αντιστοίχισης παραλλαγής στη μονάδα Somatic Variant Module στο όργανο NextSeq 550Dx με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων). Υποβλήθηκαν σε εξέταση δέκα μοναδικά δείγματα Platinum Genome FFPE (δύο με παραλλαγές αραιωμένες σε 0,05 VAF) μέσω ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 11 εκτελέσεις με τρία όργανα NextSeq 550Dx και τρεις παρτίδες NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).

Η ακρίβεια ορίστηκε για SNV, προσθήκες και διαγραφές μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων με μια καλά χαρακτηρισμένη μέθοδο αναφοράς σύνθετων, τη μέθοδο Platinum Genomes έκδοσης 2016-1.0. Τα αποτελέσματα ακρίβειας από μία εκτέλεση αλληλούχισης με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) παρέχονται ως αναφορά. Στον Πίνακα 32 αναγράφεται μια σύνοψη των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 32 Σύνοψη συμφωνίας Somatic

Κριτήρια	Συνολικές παρατηρήσεις (v2.5) ¹	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση (v2.5) ²	Αποτέλεσμα ανά παρατήρηση (v2) ³	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση (v2.5) ⁴	Αποτέλεσμα ανά εκτέλεση (v2) ⁴
PPA για SNV	528	100	100	100	100
PPA για προσθήκες	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA για διαγραφές	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

¹Υπολογίζεται ως αριθμός δειγμάτων ανά εκτέλεση επί τον αριθμό εκτελέσεων (48 δείγματα ανά εκτέλεση επί 11 εκτελέσεις = 528 παρατηρήσεις).

²Κατώτερη τιμή που παρατηρήθηκε ανά αντίγραφο δείγματος σε όλες τις εκτελέσεις (βάσει 11 εκτελέσεων για το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Κατώτερη τιμή ανά αντίγραφο δείγματος σε 1 εκτέλεση (96 συνολικές παρατηρήσεις).

⁴Κατώτερη τιμή όταν τα δεδομένα κάθε εκτέλεσης αναλύονται συγκεντρωτικά.

Ακρίβεια

Germline

Η ακρίβεια του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) με τη μονάδα Germline Variant Module αξιολογήθηκε με τη χρήση δειγμάτων Platinum Genome και ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού. Η εξέταση αποτελούνταν από την προετοιμασία μίας βιβλιοθήκης με το TruSeq Custom Amplicon Kit Dx και περιελάμβανε 12 δείγματα, κάθε ένα εκ των οποίων υποβλήθηκε σε επεξεργασία με οκτώ αντίγραφα. Οι βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με τρεις παρτίδες NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) και τρία όργανα NextSeq 550Dx για σύνολο εννέα εκτελέσεων αλληλούχισης.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με ετερόζυγες παραλλαγές για να καθοριστεί το κατά πόσον η εγγενής μεταβλητότητα του προσδιορισμού μπορεί να επηρεάσει την αντιστοίχιση του γονότυπου (N = 153 μοναδικές ετερόζυγες μεταβλητές). Το Cx ορίστηκε και για τις δύο τιμές αποκοπής της μονάδας Germline Variant Module (0,2 για ετερόζυγους και 0,7 για ομόζυγους γονότυπους), όπου x είναι το ποσοστό των επαναλαμβανόμενων εξετάσεων που υπερβαίνουν την τιμή αποκοπής. Για την κατώτερη τιμή αποκοπής 0,2 VAF, η παραλλαγή με το ελάχιστο Cx για το NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) ήταν > 99,9%, κάτι που υποδεικνύει ότι > 99,9% των ετερόζυγων παραλλαγών θα αντιστοιχίζονταν ως ετερόζυγες. Για την ανώτατη τιμή αποκοπής 0,7 VAF, η μεταβλητή με το μέγιστο Cx για το NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) ήταν < 1,5%, κάτι που υποδεικνύει ότι ≤ 1,5% των ετερόζυγων μεταβλητών θα αντιστοιχίζονταν ως ομόζυγες. Ο Πίνακας 33 συνοψίζει τα αποτελέσματα ανά τύπο μεταβλητής. Οι τιμές Cx από τη μονή εκτέλεση αλληλούχισης με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) παρέχονται ως αναφορά.

Πίνακας 33 Τιμές Cx βλαστικής σειράς για ετερόζυγες παραλλαγές

Τύπος παραλλαγής	N	Τιμή αποκοπής 0,2 VAF		Τιμή αποκοπής 0,7 VAF	
		Ελάχ. Cx (v2.5) ¹	Ελάχ. Cx (v2) ²	Μέγ. Cx (v2.5) ¹	Μέγ. Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9%	>99,9%	1,5%	1,0%
Προσθήκες	24	100%	100%	0%	<0,1%
Διαγραφές	35	100%	>99,9%	<0,1%	<0,1%

¹Τιμές Cx που βασίζονται σε εκτιμήσεις συνολικής τυπικής απόκλισης από ανάλυση στοιχείων διακυμάνσεων.

²Τιμές Cx που βασίζονται στη συνολική τυπική απόκλιση.

Somatic

Η ακρίβεια του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) με τη μονάδα Somatic Variant Module αξιολογήθηκε με τη χρήση δειγμάτων Platinum Genome και ενός αντιπροσωπευτικού προσδιορισμού. Η εξέταση αποτελούνταν από την προετοιμασία μίας βιβλιοθήκης με το TtSeq Custom Amplicon Kit Dx και περιελάμβανε δύο δείγματα, με οκτώ αντίγραφα το κάθε ένα. Οι βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με τρεις παρτίδες NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) και τρία όργανα NextSeq 550Dx για σύνολο εννέα εκτελέσεων αλληλούχισης.

Οι σωματικές παραλλαγές με αναμενόμενα επίπεδα $VAF \leq 0,10$ VAF ($N = 131$ μοναδικές παραλλαγές) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της μεταβλητότητας του οργάνου κοντά στην τιμή αποκοπής VAF της μονάδας Somatic Variant Module (οι σωματικές παραλλαγές με επίπεδο $VAF \geq 0,026$ αντιστοιχίζονται ως θετικές για την παραλλαγή). Καθορίστηκαν τιμές C95 για κάθε σωματική παραλλαγή. Οι τιμές C95 αναπαριστούν τη VAF όπου η πιθανότητα μεγαλύτερης τιμής σε σχέση με την τιμή αποκοπής VAF για τη μονάδα Somatic Variant Module είναι 95%. Οι υψηλότερες τιμές C95 ανά τύπο παραλλαγής αναγράφονται στον Πίνακα 34. Τα αποτελέσματα των τιμών C95 από μία εκτέλεση αλληλούχισης με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) παρέχονται ως αναφορά.

Πίνακας 34 Σύνοψη C95 για σωματικές παραλλαγές

Τύπος παραλλαγής	Αριθμός παραλλαγών που υποβλήθηκαν σε αξιολόγηση	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Προσθήκες	24	0,062	0,061
Διαγραφές	33	0,060	0,060

¹Τιμές C95 που βασίζονται σε εκτιμήσεις συνολικής τυπικής απόκλισης από ανάλυση στοιχείων διακυμάνσεων.

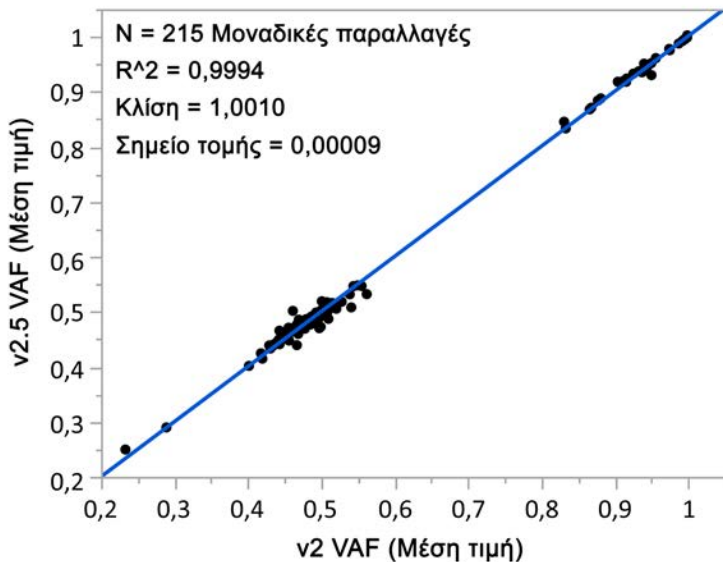
²Τιμές C95 που βασίζονται σε συνολικές τυπικές αποκλίσεις.

Σύγκριση μεθόδων (Κιτ αντιδραστηρίων)

Germline

Οι μέσες τιμές VAF από 215 μοναδικές παραλλαγές αξιολογήθηκαν σε ολόκληρο το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και στο NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) με αποτελέσματα που δημιουργήθηκαν από τη μονάδα Germline Variant Module. Οι μέσοι όροι των τιμών VAF υπολογίστηκαν από 11 εκτελέσεις αλληλούχισης (v2.5) και από μία εκτέλεση αλληλούχισης (v2). Χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον οκτώ αντίγραφα για τον υπολογισμό του μέσου όρου κάθε παραλλαγής. Στο Εικόνα 3 αποτυπώνεται η συσχέτιση VAF μεταξύ των δύο κιτ αντιδραστηρίων. Βάσει της ισχυρής γραμμικής συσχέτισης VAF και της ομοιότητας των αποτελεσμάτων μεταξύ των κιτ αντιδραστηρίων, τα χαρακτηριστικά της απόδοσης που είχαν αρχικά επαληθευτεί και τεκμηριωθεί με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) με τη μονάδα Germline Variant Module θεωρούνται ότι ισχύουν και για το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).

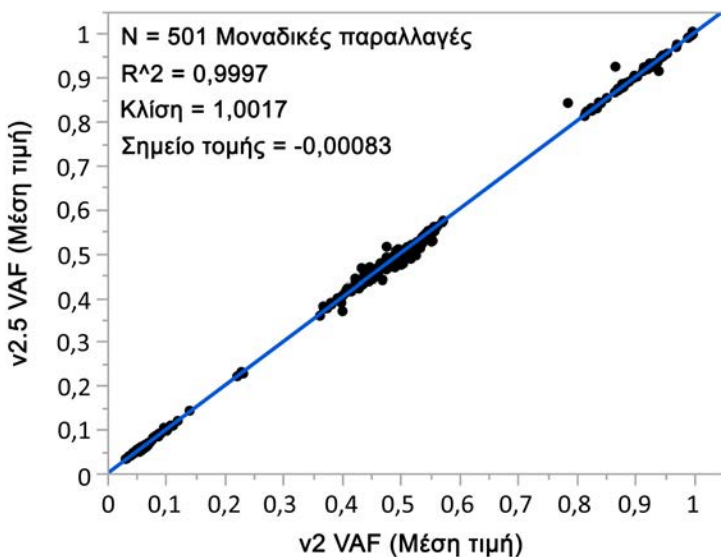
Εικόνα 3 Συσχέτιση της συχνότητας αλληλόμορφων παραλλαγής (VAF) της μονάδας Germline Variant Module μεταξύ του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).



Somatic

Οι μέσες τιμές VAF από 501 μοναδικές παραλλαγές αξιολογήθηκαν σε ολόκληρο το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και στο NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) με αποτελέσματα που δημιουργήθηκαν από τη μονάδα Somatic Variant Module. Οι μέσοι όροι των τιμών VAF υπολογίστηκαν από 11 εκτελέσεις αλληλούχισης (v2.5) και από μία εκτέλεση αλληλούχισης (v2). Χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον τρία αντίγραφα για τον υπολογισμό του μέσου όρου κάθε μοναδικής παραλλαγής. Στο **Εικόνα 4** αποτυπώνεται η συσχέτιση VAF μεταξύ των δύο kit αντιδραστηρίων. Βάσει της συσχέτισης VAF και της ομοιότητας των αποτελεσμάτων μεταξύ των kit αντιδραστηρίων, τα χαρακτηριστικά της απόδοσης που είχαν επαληθευτεί και τεκμηριωθεί με το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) με τη μονάδα Somatic Variant Module θεωρούνται ότι ισχύουν και για το NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).

Εικόνα 4 Η συσχέτιση της συχνότητας αλληλόμορφων παραλλαγής (VAF) της μονάδας Somatic Variant Module μεταξύ του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων) και του NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων).



Ιστορικό αναθεώρησης

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 1000000030326 v06	Μάιος 2022	Ενημερώσεις που έγιναν για τη διόρθωση του περιεχομένου που προστέθηκε ακούσια από λογισμικό προέλευσης.
Αρ. εγγράφου 1000000030326 v05	Νοέμβριος 2021	Προσθήκη δήλωσης στην ενότητα «Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις» σχετικά με την αναφορά σοβαρών συμβάντων. Προσθήκη δήλωσης στην ενότητα «Αρχές της διαδικασίας» στην οποία καθορίζεται ο προβλεπόμενος χρήστης. Αφαίρεση αναφοράς στο High Output Reagent Kit v2 (300 κύκλων). Προσθήκη αναφοράς στο High Output Reagent Kit v2.5 (75 κύκλων).
Αρ. εγγράφου 1000000030326 v04	Αύγουστος 2021	Προσθήκη πίνακα ιστορικού αναθεωρήσεων. Ενημέρωση της διεύθυνσης εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου στην ΕΕ.

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλής χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του(-ων) εν λόγω προϊόντος(-ων).

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ), ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ).

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ(-ΩΝ) ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ(-ΤΩΝ) ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ(-ΟΥΣ) Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

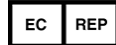
© 2022 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα σήματα κατατεθέντα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα σήματα κατατεθέντα, επισκεφτείτε την ηλεκτρονική διεύθυνση www.illumina.com/company/legal.html.

Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 Η.Π.Α.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Κάτω Χώρες

Χορηγός στην Αυστραλία

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

Επισήμανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά στα σύμβολα που μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων για το κιτ σας στη διεύθυνση support.illumina.com.