

Instrument NextSeq™ 550Dx

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIČKU UPOTREBU
SAMO ZA IZVOZ

Kataloški broj 20005715

Namena

Instrument NextSeq 550Dx je namenjen za sekvenciranje DNK biblioteka kada se koristi sa analizama za *in vitro* dijagnostiku. Instrument NextSeq 550Dx mora da se koristi sa određenim registrovanim, sertifikovanim ili odobrenim reagensima za *in vitro* dijagnostiku i analitičkim softverom.

Načela postupka

Instrument Illumina NextSeq 550Dx je namenjen za sekvenciranje DNK biblioteka kada se koristi sa analizama za *in vitro* dijagnostiku; takođe je namenjen za korišćenje među kvalifikovanim osobljem kliničkih laboratorija koje je obučeno za rad sa *in vitro* dijagnostičkim procedurama koje se obavljaju u kliničkim laboratorijama. Instrument NextSeq 550Dx kao ulaz koristi biblioteke generisane iz DNK kod kojih se indeksi uzorka i prikupljene sekvence dodaju amplifikovanim ciljevima. Biblioteke sa uzorcima se snimaju u protočnoj ćeliji i sekvenciraju na instrumentu hemijskim postupkom sekvenciranja sintezom (eng. sequencing by synthesis, SBS). Hemijski postupak sekvenciranja sintezom koristi metodu reverzibilnog terminatora za otkrivanje fluorescentno označenih jednonukleotidnih baza dok se one inkorporiraju u rastuće DNK lance. Softver Real-Time Analysis (RTA) analizira slike i određuje baze, pa svakoj bazi dodeljuje ocenu kvaliteta za svaki ciklus sekvenciranja. Kada se primarna analiza završi, na instrumentu može da se izvrši sekundarna analiza radi obrade određivanja baza. NextSeq 550Dx koristi različite module za sekundarnu analizu, u zavisnosti od toka rada. Za module Germline Variant (Germinativna varijanta) ili Somatic Variant (Somatska varijanta), obrada uključuje demultipleksiranje, generisanje FASTQ datoteka, poravnanje, određivanje varijanti i generisanje datoteka u formatu za određivanje varijanti (VCF i gVCF). VCF i gVCF datoteke sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim pozicijama u referentnom genomu.

Konfiguracija za dva načina pokretanja sistema

NextSeq 550Dx sadrži konfiguraciju za dva načina pokretanja sistema kako bi se omogućilo korišćenje instrumenta u dijagnostičkom (Dx) ili isključivo istraživačkom režimu (RUO). Analize za sekvenciranje za *in vitro* dijagnostiku (IVD), uključujući module Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta), izvršavaju se u dijagnostičkom režimu. U dijagnostičkom režimu se mogu koristiti samo reagensi za sekvenciranje za IVD. Karakteristike performansi i ograničenja postupka za instrument NextSeq 550Dx utvrđeni su pomoću modula Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta) u dijagnostičkom režimu.

Ograničenja postupka

- 1 Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- 2 Kada se moduli Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta) koriste sa kompletima reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) ili kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa), mogu da daju sledeće:
 - ▶ izlazni rezultat sekvenciranja ≥ 90 gigabaza (Gb)
 - ▶ dužinu očitavanja (u obradi sa uparenim krajevima) 2 x 150 parova baza (bp)
 - ▶ baze jednake ili veće od Q30 $\geq 75\%$ pri dužini očitavanja od 2 x 150 bp

- baze jednake ili veće od 75% imaju ocene kvaliteta na skali Phred ≥ 30 , što ukazuje na tačnost određivanja baza veću od 99,9%
- 3 Očitavanja sa indelima (inercije, delecije ili kombinacije) kod kojih je dužina sadržaja >25 bp nisu poravnata u softveru za analizu. Zato softver za analizu ne može da prepozna indele dužine >25 bp.
 - 4 Softver za analizu možda ne može da poravna očitavanja amplicona sa ekstremnim sadržajem varijanti, što dovodi do evidentiranja regiona kao regiona divljeg tipa. Takav ekstremni sadržaj obuhvata:
 - ▶ očitavanja koja sadrže više od tri indela
 - ▶ očitavanja dužine najmanje 30 bp sa sadržajem varijante sa jednim nukleotidom (SNV) >4% od ukupne ciljane dužine amplicona (isključujući probne regione)
 - ▶ očitavanja dužine <30 bp sa sadržajem varijante sa jednim nukleotidom (SNV) >10% od ukupne dužine amplicona (uključujući probne regione)
 - 5 Velike varijante, uključujući varijante sa više nukleotida (MNV) i veliki indeli mogu da se evidentiraju kao manje varijante u izlaznoj VCF datoteci.
 - 6 Varijante delecije mogu da se filtriraju ili propuste kada se prostiru duž dva amplicona u kvadratićima ako je dužina delecije veća od preklapanja između amplicona u kvadratiću ili mu je jednaka.
 - 7 Sistem ne može da otkrije indele ako se jave odmah pored prajmera i ako nema preklapajućeg amplicona. U slučaju regiona sa preklapajućim ampliconima, analiza ne može da otkrije delecije kada je region preklapanja manji od veličine delecije koju je potrebno otkriti. Na primer, ako region preklapanja između dva susedna amplicona čine dve baze, analiza ne može da otkrije delecije koje obuhvataju obe baze. Delecija jedne od tih baza može da se otkrije.
 - 8 Kao i u svakom toku rada pripreme biblioteke zasnovane na hibridizaciji, osnovni polimorfizmi, mutacije, insercije ili delecije u regionima vezivanja oligonukleotida mogu uticati na ispitivanje alela i na određivanja tokom sekvenciranja. Na primer:
 - ▶ Varijanta u fazi sa varijantom u regionu prajmera možda neće biti amplifikovana, što će dovesti do lažno negativnog rezultata.
 - ▶ Varijante u regionu prajmera mogu da spreče amplifikovanje referentnog alela, što će dovesti do netačnog određivanja homozigotne varijante.
 - ▶ Varijante indela u regionu prajmera mogu dovesti do lažnog pozitivnog određivanja na kraju očitavanja neposredno uz prajmer.
 - 9 Zahvaljujući otklonu lanca, indeli mogu da se filtriraju ako se jave pri kraju jednog očitavanja i ako se tokom poravnanja ignorišu.
 - 10 Male varijante sa više nukleotida (MNV) nisu proverene i evidentiraju se samo u modulu Somatic Variant.
 - 11 Delecije se evidentiraju u VCF datoteci na koordinatama prethodne baze u skladu sa VCF formatom. Zato uzmite u obzir susedne varijante pre nego što evidentirate da je pojedinačno određivanje baze homozigotna referenca.
 - 12 Ograničenja specifična za modul Germline Variant (za germinativne ćelije):
 - ▶ Instrument NextSeq 550Dx, kada koristi modul Germline Variant softvera Local Run Manager (lokalni upravljač za pokretanje) za NextSeq 550Dx, dizajniran je da pruži kvalitativne rezultate za određivanje varijanti germinativnih (klicinih) ćelija (npr. homozigot, heterozigot, divlji tip).
 - ▶ Kada se koristi sa modulom Germline Variant, minimalna pokrivenost po ampliconu potrebna za tačno određivanje varijanti iznosi 150x. Zato je potrebno 150 fragmenata DNK, što je ekvivalentno broju od 300 preklopljenih očitavanja uparenih krajeva. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utiču na pokrivenost. Na pokrivenost mogu da utiču sadržaj GC i drugi genomski sadržaj.
 - ▶ Varijacija broja kopija može da utiče na to da li će varijanta biti prepoznata kao homozigotna ili heterozigotna.
 - ▶ Varijante u određenim ponavljajućim kontekstima filtriraju se iz VCF datoteka. Filter za ponavljanja RMxN se koristi za filtriranje varijanti ako se cela sekvenca varijante ili njen deo ponavljaju u referentnom genomu pored pozicije varijante. Pri određivanju varijanti germinativnih ćelija, potrebno je najmanje devet ponavljanja u referentnom sadržaju da bi varijanta bila filtrirana. U obzir se uzimaju samo ponavljanja dužine najviše 5 bp (R5x9).
 - ▶ Jedan indel i jedan SNV na jednom lokusu mogu da dovedu do izveštavanja o samo jednoj varijanti.

13 Ograničenja specifična za somatsku varijantu.

- ▶ Instrument NextSeq 550Dx, kada koristi modul Somatic Variant softvera Local Run Manager za NextSeq 550Dx, dizajniran je da pruži kvalitativne rezultate za određivanje varijanti somatskih ćelija (npr. prisutnost somatske varijante sa frekvencijom varijante veće od ili jednake 0,026 i granicom otkrivanja od 0,05).
- ▶ Kada se koristi sa modulom Somatic Variant, minimalna pokrivenost po amplikonu potrebna za tačno određivanje varijanti iznosi 450x po skupu oligonukleotida. Zato je potrebno 450 fragmenata DNK po skupu oligonukleotida, što je ekvivalentno broju od 900 preklapljenih očitavanja uparenih krajeva. Broj uzoraka i ukupan broj ciljanih baza utiču na pokrivenost. Na pokrivenost mogu da utiču sadržaj GC i drugi genomske sadržaj.
- ▶ Pri određivanju varijanti somatskih (telesnih) ćelija, potrebno je najmanje šest ponavljanja u referentnom sadržaju da bi varijanta bila filtrirana, a u obzir se uzimaju samo ponavljanja dužine najviše 3 bp (R3x6).
- ▶ Modul Somatic Variant ne može da razlikuje varijante germinativnih ćelija od varijanti somatskih ćelija. Modul je namenjen za otkrivanje varijanti u velikom opsegu frekvencija varijanti, ali se frekvencija varijanti ne može koristiti za razlikovanje somatskih varijanti od varijanti germinativnih ćelija.
- ▶ Normalno tkivo uzorka utiče na otkrivanje varijante. Evidentirana granica otkrivanja je zasnovana na frekvenciji varijante u odnosu na ukupnu DNK ekstrahovanu iz tumorskog i normalnog tkiva.

Komponente proizvoda

- 1 Instrument NextSeq 550Dx (kataloški broj 20005715)
- 2 Softverske komponente za instrument NextSeq 550Dx, uključujući sledeće:

Softverska aplikacija	Funkcija	Opis
Softver NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Kontroliše rad instrumenta	Softverska aplikacija NOS upravlja radom instrumenta tokom sekvenciranja i generiše slike koje koristi softver Real-Time Analysis (RTA, analiza u realnom vremenu).
Softver Real-Time Analysis (RTA, analiza u realnom vremenu)	Obavlja primarnu analizu	Slike koje NOS generiše za svaki kvadratić po ciklusu obrade sekvenciranjem, softverska aplikacija RTA konvertuje u datoteke za određivanje baza koje predstavljaju ulazne podatke za module za analizu softvera Local Run Manager (lokalni upravljač za pokretanje). Softverska aplikacija RTA nema korisnički interfejs.
Local Run Manager (Lokalni upravljač za pokretanje)	Interfejs za izbor modula	Softver Local Run Manager je integrisano rešenje koje se nalazi na instrumentu i služi za upravljanje korisnicima, izbor odgovarajućeg modula za analizu i nadzor statusa.
Somatic Variant Module (Modul somatske varijante)	Obavlja sekundarnu analizu	Ovaj softverski modul za analizu komponente Local Run Manager obrađuje određivanje baza putem sekundarne analize. Obrada obuhvata demultipleksiranje, generisanje FASTQ datoteke, poravnanje, određivanje varijanti i izveštavanje. Modul za određivanje varijanti (Pisces) generiše VCF datoteke koje sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim pozicijama u referentnom genomu i obuhvata izmerenu frekvenciju varijante.
Germline Variant Module (Modul germinativne varijante)	Obavlja sekundarnu analizu	Ovaj softverski modul za analizu komponente Local Run Manager obrađuje određivanje baza putem sekundarne analize. Obrada obuhvata demultipleksiranje, generisanje FASTQ datoteke, poravnanje, određivanje varijanti i izveštavanje. Modul za određivanje varijanti (Pisces) generiše VCF datoteke koje sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim pozicijama u referentnom genomu i identifikuje svaku varijantu kao heterozigotnu ili homozigotnu.

Radni uslovi

Element	Specifikacija
Temperatura	U laboratoriji održavajte temperaturu između 19 °C i 25 °C (22 °C ± 3 °C). Ova temperatura je radna temperatura instrumenta. Tokom rada, nemojte dozvoliti da temperatura okruženja menja vrednost za više od ±2 °C.
Vlažnost	Održavajte nekondenzujuću relativnu vlažnost između 20% i 80%.

Oprema i materijali

Obavezna oprema i materijali, prodaju se zasebno

Komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 ciklusa), kataloški broj 20028870

Komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa), kataloški broj 20028871

Obavezna oprema i materijali koji nisu priloženi

Potrošni materijal za obrade sekvenciranjem, obezbeđuje korisnik

Potrošni materijal	Dobavljač	Svrha
Maramice sa alkoholom, 70%-tni izopropil ili Etanol, 70%	VWR, kataloški br. 95041-714 (ili ekvivalentno sredstvo) Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora	Čišćenje protočne ćelije i opšta namena
Laboratorijska maramica, ne ostavlja tragove	VWR, kataloški br. 21905-026 (ili ekvivalentno sredstvo)	Čišćenje protočne ćelije i opšta namena

Potrošni materijal za održavanje instrumenta, obezbeđuje korisnik

Potrošni materijal	Dobavljač	Svrha
NaOCl, 5% (natrijum-hipohlorit)	Sigma-Aldrich, kataloški br. 239305 (ili ekvivalent laboratorijskog kvaliteta)	Pranje instrumenta ručnim ispiranjem nakon obrade; razblaženo na 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, kataloški br. P7949	Pranje instrumenta opcijama ručnog pranja; razblaženo na 0,05%
Voda, laboratorijskog kvaliteta	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora	Pranje instrumenta (ručno pranje)
Filter za vazduh	Illumina, kataloški br. 20022240	Čišćenje vazduha koji instrument uvlači za hlađenje

Smernice za vodu laboratorijskog kvaliteta

Za obavljanje postupaka na instrumentu uvek koristite vodu laboratorijskog nivoa kvaliteta ili dejonizovanu vodu. Nemojte koristiti vodu iz vodovoda. Koristite samo vodu sledećih nivoa ili ekvivalente:

- ▶ Dejonizovana voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Voda od 18 megaoma (MΩ)
- ▶ Voda Milli-Q
- ▶ Voda Super-Q
- ▶ Voda za primenu u molekularnoj biologiji

Upozorenja i mere predostrožnosti

OPREZ Savezni zakon propisuje da samo lekari ili drugi stručnjaci koje je licencirala država u kojoj deluju mogu da prodaju ovaj proizvod ili izdaju nalog za njegovu prodaju, odnosno da ga koriste ili prepisu njegovo korišćenje.

- 1 **Neke komponente reagensa koje kompanija Illumina dostavlja za korišćenje sa instrumentom NextSeq 550Dx sadrže potencijalno opasne hemikalije. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijski mantil odgovarajuće za opasnost od izlaganja. Iskorišćenim reagensima treba rukovati kao sa hemijskim otpadom i odložiti ih na otpad u skladu sa primenljivim regionalnim, nacionalnim i lokalnim zakonima i propisima.** Dodatne informacije o zaštiti životne sredine, zdravlju i bezbednosti potražite u Bezbednosnim listovima (SDS) na veb-sajtu support.illumina.com/sds.html.
- 2 Sve ozbiljne incidente u vezi sa ovim proizvodom odmah prijavite kompaniji Illumina i nadležnim organima u državama članicama u kojima se nalaze korisnik i pacijent.
- 3 Sa svim uzorcima krvi rukujte kao da je poznato da su inficirani virusom humane imunodeficijencije (HIV), virusom humanog hepatitisa B (HBV) i drugim patogenim agensima koji se prenose krvlju (univerzalne mere predostrožnosti).
- 4 Nepridržavanje navedenih procedura može dovesti do pogrešnih rezultata ili značajnog smanjenja kvaliteta uzoraka.
- 5 Pridržavajte se rutinskih laboratorijskih mera predostrožnosti. Ne primenjujte pipetiranje ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u prostorima namenjenim za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijsku odeću kada rukujete uzorcima i reagensima kompleta. Ruke temeljno operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima kompleta.
- 6 Odgovarajuće laboratorijske prakse i dobra higijena u laboratoriji su obavezni da bi se sprečila kontaminacija reagensa, instrumenata i genomskih DNK uzoraka PCR proizvodima. Kontaminacija PCR proizvodima može dovesti do netačnih i nepouzdanih rezultata.
- 7 Da biste sprečili kontaminaciju, uverite se da se u područjima pre amplifikacije i područjima posle amplifikacije koristi posebna oprema i potrošni materijal (npr. pipete, nastavci za pipete, blokovi za zagrevanje, Vortex mešalice i centrifuge).
- 8 Uparivanje indeksa sa uzorkom mora tačno da se podudara sa odštampanim rasporedom na pločici. Local Run Manager automatski popunjava prajmere za indeksiranje povezane sa nazivima uzoraka kada se umetnu u modul. Korisniku se savetuje da pre pokretanja obrade sekvenciranjem proveri prajmere za indeksiranje povezane sa uzorcima. Nepodudaranja između uzoraka i rasporeda na pločici dovodi do nemogućnosti pozitivne identifikacija uzorka i dobijanja netačnih rezultata.
- 9 Preporučuje se instalacija antivirusnog softvera prema izboru korisnika radi zaštite računara od virusa. Uputstva za instalaciju potražite u korisničkom priručniku.
- 10 Nemojte raditi sa instrumentom NextSeq 550Dx kada su sa njega uklonjene ploče. Rad sa instrumentom sa koga je uklonjena neka od ploča predstavlja opasnost od izlaganja naponu električne mreže ili naponu jednosmerne struje.
- 11 Ne dirajte postolje protočne ćelije u odeljku sa protočnom ćelijom. Grejač u ovom odeljku radi na temperaturi između 22 °C i 95 °C i može dovesti do opekotina.
- 12 Masa instrumenta iznosi oko 84 kg (185 lb), pa ako instrument ispadne ili se njime nepažljivo rukuje, može uzrokovati tešku povredu.

Uputstvo za korišćenje

Sledeća uputstva za korišćenje odnose se na korišćenje modula Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta) u dijagnostičkom režimu na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) ili kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).

Unos informacija o obradi

Detaljna uputstva potražite u referentnom vodiču za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 100000009513) i odgovarajućem vodiču za modul Local Run Manager.

Podešavanje parametara

- 1 Prijavite se na Local Run Manager (lokalni upravljač za pokretanje).
- 2 Izaberite **Create Run** (Kreiraj obradu), pa **Somatic Variant** (Somatska varijanta) ili **Germline Variant** (Germinativna varijanta).
- 3 Unesite naziv obrade koji identifikuje obradu od sekvenciranja do analize.
Koristite alfanumeričke znakove, razmake, donje crte ili crtice.
- 4 **[Opcionalno]** Unesite opis obrade da biste je lakše razlikovali.
Koristite alfanumeričke znakove, razmake, donje crte ili crtice.
- 5 Na padajućoj listi izaberite broj uzoraka i skup indeksa.
Prilikom izbora uzmite u obzir sledeće informacije.
 - ▶ Padajuća lista sadrži brojeve uzoraka sa skupom indeksa. Na primer, 24-Set 1 znači da će se testirati 24 uzorka sa indeksima iz skupa indeksa 1.
 - ▶ Brojevi skupova indeksa se odnose na različite skupove i5 i i7 parove indeksa. Skup 1 i skup 2 omogućavaju raznovrsnost indeksa. Ponuđena su dva skupa indeksa kako bi se sprečilo iscrpljivanje jednog skupa.
 - ▶ Odaberite broj uzoraka koji je najbliži broju uzoraka koji testirate. Ako tačan broj uzoraka nije na listi, izaberite broj koji je najbliži, ali manji od broja koji testirate. Na primer, ako želite da testirate 18 uzoraka, izaberite 16 uzoraka.
 - ▶ Predloženi otvori sa uzorcima i kombinacije indeksa koji ispunjavaju uslove za raznovrsnost indeksa istaknuti su zelenom bojom.

Uvoz datoteka manifesta za obradu

- 1 Uverite se da su manifesti koje želite da uvezete dostupni na pristupačnoj mrežnoj lokaciji ili na USB disku.
- 2 Izaberite **Import Manifests** (Uvezi manifeste).
- 3 Dođite do datoteke manifesta i izaberite manifest koji želite da dodate.

NAPOMENA Da bi datoteke manifesta bile dostupne za sve obrade pomoću modula za analizu Germline Variant (Germinativna varijanta) ili Somatic Variant (Somatska varijanta), dodajte manifeste koristeći funkciju „Module Settings” (Podešavanja modula). Za korišćenje ove funkcije potrebne su administratorske dozvole. Više informacija potražite u *referentnom vodiču za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 100000009513)*.


Navođenje uzoraka za obradu

Navedite uzorke za obradu pomoću jedne od opcija i sledećih smernica.


- ▶ **Enter samples manually** (Ručni unos uzoraka) – koristite praznu tabelu na ekranu Create Run (Kreiranje obrade).
- ▶ **Import samples** (Uvoz uzoraka) – otvorite spoljnu datoteku u formatu vrednosti odvojenih zarezom (*.csv). Predložak možete da preuzmete na ekranu Create Run (Kreiranje obrade).

Ručni unos uzoraka

- 1 Unesite jedinstveni naziv uzorka (**modul za analizu Somatic Variant (Somatska varijanta)**) ili ID uzorka (**modul za analizu Germline Variant (Germinativna varijanta)**).
Koristite alfanumeričke znakove, crtice ili donje crte.
- 2 **[Opcionalno]** Za pozitivne ili negativne kontrolne uzorke možete da kliknete desnim tasterom i izaberete vrstu kontrole.
Kontrola u jednom otvoru sa uzorkom se automatski upisuje u odgovarajući otvor sa istom kontrolom u drugom skupu.
- 3 **[Opcionalno]** Unesite opis uzorka u polje „Sample Description” (Opis uzorka).
Koristite alfanumeričke znakove, crtice ili donje crte.

- 4 Izaberite adapter za Indeks 1 na padajućoj listi za Indeks 1 (i7).
Kada koristite predložene otvore sa uzorcima, softver automatski popunjava i7 i i5 adaptore za indeks koji ispunjavaju uslove za raznovrsnost indeksa. Ako tačan broj uzoraka koji testirate nije na listi, obavezno izaberite adaptore indeksa za dodatne otvore.
- 5 Izaberite adapter za Indeks 2 na padajućoj listi za indeks 2 (i5).
- 6 Izaberite datoteku manifesta na padajućoj listi Manifest.
Uzorci iz skupa A treba da imaju drugačiji manifest od uzoraka iz skupa B.
- 7 Izaberite opciju za prikaz, štampanje ili čuvanje rasporeda pločice kao reference za pripremu biblioteka:
 - Izaberite ikonu  **Print** (Štampaj) da biste prikazali raspored pločice. Izaberite **Print** (Štampaj) da biste štampali raspored pločice.
 - Izaberite **Export** (Izvoz) da biste izvezli informacije o uzorcima u spoljnu datoteku.
- 8 Izaberite **Save Run** (Sačuvaj obradu).

Uvoz uzoraka

- 1 Izaberite **Import Samples** (Uvezi uzorke) i idite do lokacije datoteke sa informacijama o uzorcima. Možete da uvezete dve vrste datoteka.
 - Na ekranu „Create Run” (Kreiraj obradu) izaberite **Template** (Predložak) da biste napravili novi raspored pločice. Datoteka predložka sadrži tačna zaglavlja kolona za uvoz. Unesite informacije o uzorku u svaku kolonu za uzorke u obradi. Izbršite primere informacija iz ćelija koje se ne koriste, pa sačuvajte datoteku.
 - Koristite datoteku sa informacijama o uzorcima koja je izvezena iz modula Germline Variant (Germinativna varijanta) ili Somatic Variant (Somatska varijanta) pomoću funkcije „Export” (Izvoz).
- 2 Izaberite ikonu  **Print** (Štampaj) da biste prikazali raspored pločice.
- 3 Izaberite **Print** (Štampaj) da biste odštampali raspored pločice kao referencu za pripremu biblioteka.
- 4 Izaberite **Save Run** (Sačuvaj obradu).

Priprema kertridža reagensa

Obavezno pažljivo pratite smernice za kertridž reagensa da bi sekvenciranje bilo uspešno.

- 1 Izvadite kertridž reagensa iz skladišta u kom je temperatura od -25 °C do -15 °C.
- 2 Izaberite jednu od sledećih metoda odmrzavanja reagensa. Ne potapajte kertridž u tečnost. Kada se kertridž odmrzne, osušite ga pre prelaska na sledeći korak.

Temperatura	Vreme odmrzavanja	Granica stabilnosti
Vodena kupka temperature od 15 °C do 30 °C	60 minuta	Ne sme premašiti 6 sati
Od 2 °C do 8 °C	7 sati	Ne sme premašiti 5 dana

NAPOMENA Ako se u istoj vodenoj kupki odmrzava više kertridža, vreme odmrzavanja se produžava.

- 3 Preokrenite kertridž pet puta da biste promešali reagense.
- 4 Pregledajte dno kertridža da biste se uverili da su reagensi odmrznuti i ne sadrže talog. Potvrdite da su pozicije 29, 30, 31 i 32 odmrznute jer su one najveće i treba im najviše vremena da se odmrznu.
- 5 Blago lupnite o sto da biste smanjili broj mehurića vazduha.
Da biste postigli najbolje rezultate, odmah unesite uzorak i podesite obradu.

Priprema protočne ćelije

- 1 Izvadite kutiju sa novom protočnom ćelijom iz skladišta u kom je temperatura od 2 °C do 8 °C.
- 2 Izvadite pakovanje u foliji iz kutije i odložite 30 minuta na sobnoj temperaturi.

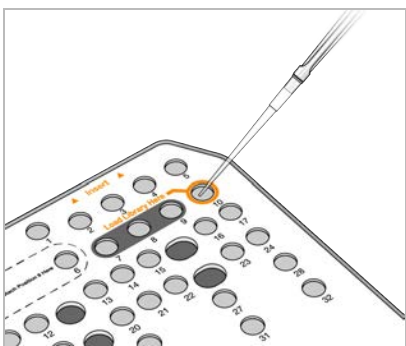
Priprema biblioteka za sekvenciranje

Denaturišite i razredite biblioteke na ulaznu zapreminu od 1,3 ml. U praksi, ulazna koncentracija može da se razlikuje u zavisnosti od pripreme biblioteke i metoda kvantifikacije. Razređivanje biblioteka uzoraka zavisi od složenosti oligonukleotidnih skupova. Uputstva za pripremu biblioteka uzoraka za sekvenciranje, uključujući razređivanje biblioteka i formiranje skupova, potražite u odeljku „Uputstva za korišćenje” odgovarajućeg kompleta za pripremu biblioteka. Potrebna je optimizacija gustine klastera na instrumentu NextSeq 550Dx.

Unos biblioteka u kertridž reagensa

- 1 Očistite zaštitnu foliju koja prekriva rezervoar br. 10 sa oznakom **Load Library Here** (Ovde unesite biblioteku) koristeći maramicu koja ne ostavlja tragove.
- 2 Probušite foliju čistim nastavkom pipete od 1 ml.
- 3 Unesite 1,3 ml pripremljenih biblioteka u rezervoar br. 10 sa oznakom **Load Library Here** (Ovde unesite biblioteku). Ne dodirujte zaštitnu foliju prilikom pipetiranja biblioteka.

Slika 1 Unos biblioteka



Podlašavanje obrade sekvenciranjem

- 1 Prijavite se na NextSeq 550Dx koristeći lozinku za softver Local Run Manager.
- 2 Na početnom ekranu softvera NOS izaberite **Sequence** (Sekvenciranje).
- 3 Izaberite obradu na listi, pa zatim **Next** (Sledeće).
Otvora se niz ekrana za podešavanje obrade sledećim redosledom: Load Flow Cell (Unos protočne ćelije), Load Buffer Cartridge (Unos ketridža pufera), Load Reagent Cartridge (Unos ketridža reagensa) i Pre-run Check (Provera pre obrade).
- 4 Kada se prikaže ekran Load Flow Cell (Unos protočne ćelije), očistite i unesite protočnu ćeliju.
 - ▶ Izvadite protočnu ćeliju iz folije u kojoj je zapakovana.
 - ▶ Otvorite preklopno pakovanje od prozirnne plastike i izvadite protočnu ćeliju.
 - ▶ Očistite staklenu površinu protočne ćelije alkoholnom maramicom koja ne ostavlja tragove. Staklo osušite laboratorijskom maramicom koja ne ostavlja tragove.
 - ▶ Uverite se da je staklena površina protočne ćelije čista. Ako je potrebno, ponovite korak čišćenja.
 - ▶ Uklonite iskorišćenu protočnu ćeliju iz prethodne obrade.
 - ▶ Poravnajte protočnu ćeliju koristeći čiode za poravnavanje i postavite protočnu ćeliju na postolje.
- 5 Izaberite **Load** (Unos).
Vrata se automatski zatvaraju. ID protočne ćelije se pojavljuje na ekranu i proveravaju se senzori.
- 6 Pratite upite softvera da biste ispraznili potrošeni kontejner reagensa, uneli ketridž pufera za NextSeq 550Dx i ketridž reagensa za NextSeq 550Dx.
Kada su uneti ketridž pufera i reagensa za NextSeq 550Dx, softver očitava i evidentira RFID. ID-ovi ketridža pufera i reagensa se pojavljuju na ekranu i proveravaju se senzori.

- 7 Kada se završi automatska provera pre obrade, izaberite **Start** (Pokreni). (Ovo nije potrebno ako je konfigurisano automatsko pokretanje).
- 8 Kada započne obrada, otvara se ekran Sequencing (Sekvenciranje). Ovaj ekran sadrži vizualni prikaz obrade u toku, uključujući i intenzitete i ocene kvaliteta (Q-ocene).

Rezultati

Softver Real-Time Analysis (RTA) je integrisani softver koji analizira slike i određuje baze, pa svakoj bazi dodeljuje ocenu kvaliteta za svaki ciklus sekvenciranja. Kada se završi primarna analiza, izabrani modul Local Run Manager na instrumentu NextSeq 550Dx automatski započinje sekundarnu analizu. Procesi sekundarne analize opisani ovde odnose se na module Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta).

Demultipleksiranje

Demultipleksiranje upoređuje svaku sekvencu očitavanja indeksa sa sekvencama indeksa navedenim za obradu. U ovom koraku se ne razmatraju vrednosti za kvalitet.

Očitavanja indeksa se identifikuju pomoću sledećih koraka:

- ▶ Uzorci se numerišu počev od 1 na osnovu redosleda kojim su navedeni za obradu.
- ▶ Broj uzorka 0 je rezervisan za klastere koji nisu dodeljeni uzorku.
- ▶ Klasteri se dodeljuju uzorku kada se sekvenca indeksa tačno podudara ili kada se nađe najviše jedno nepodudaranje po očitavanju indeksa.

Generisanje FASTQ datoteke

Nakon demultipleksiranja softver generiše sporedne datoteke analize u formatu FASTQ, što je tekstualni format koji se koristi za predstavljanje sekvenci. FASTQ datoteke sadrže očitavanja za svaki uzorak i povezane ocene kvaliteta. Klasteri koji nisu prošli filter se izostavljaju.

Svaka FASTQ datoteka sadrži očitavanja samo za jedan uzorak, a naziv tog uzorka uvršten je u naziv FASTQ datoteke. U modulima Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta), osam FASTQ datoteka se generiše po uzorku i po skupu oligonukleotida, četiri iz 1. očitavanja i četiri iz 2. očitavanja. Krajnji rezultat je ukupno 8 FASTQ datoteka za Germline (Germinativne ćelije) i 16 FASTQ datoteka za Somatic (Somatske ćelije) po uzorku. FASTQ datoteke su primarne ulazne datoteke za poravnanje.

Poravnanje

Tokom koraka poravnanja, Smit-Vatermanov algoritam poravnjava klastere iz svakog uzorka sa sekvencama amplikona navedenim u datoteci manifesta.

Smit-Vatermanov algoritam obavlja poluglobalno poravnanje sekvenci da bi odredio slične regione između dve sekvence. Umesto da poredi celu sekvencu, Smit-Vatermanov algoritam poredi segmente svih mogućih dužina.

Svako očitavanje sa uparenim krajevima se procenjuje u pogledu poravnanja sa relevantnim probnim sekvencama za to očitavanje.

- ▶ Prvo očitavanje se procenjuje u odnosu na reverzni komplement silaznih oligonukleotida specifičnih za lokus (Downstream Locus-Specific Oligos, DLSO).
- ▶ Drugo očitavanje se procenjuje u odnosu na uzlazne oligonukleotide specifične za lokus (Upstream Locus-Specific Oligos, ULSO).
- ▶ Ako se početak očitavanja podudara sa probnom sekvencom uz ne više od jednog nepodudaranja, puna dužina očitavanja se poravnava sa amplikonskim ciljem za tu sekvencu.
- ▶ Ako se početak očitavanja podudara sa probnom sekvencom uz najviše tri razlike (nepodudaranja ili pomaci zbog vodećih indela), puna dužina očitavanja se poravnava sa amplikonskim ciljem za tu sekvencu.
- ▶ Indeli u DLSO-u i ULSO-u se ne razmatraju zbog hemije analize.

Poravnanja se filtriraju iz rezultata poravnanja na osnovu stopa nepodudaranja u regionu od interesa ili celom amplikonu, u zavisnosti od dužine amplikona. Filtrirana poravnanja se zapisuju u datoteke poravnanja kao neporavnata i ne koriste se za određivanje varijanti.

Određivanje varijanti

Modul za određivanje varijanti Pisces je namenjen za određivanje varijanti sa jednim nukleotidom i indelima u bibliotekama pripremljenim za instrument.

Izveštaji i dodatne izlazne datoteke

Moduli za analizu varijanti generišu PDF izveštaje i izveštaje u vidu tekstualne (*.txt) datoteke razdvojene tabulatorima u kojima se prikazuju pokazatelji kao što su dubina sekvenciranja i broj varijanti. Moduli generišu i izlazne datoteke u VCF i gVCF Variant Call Format genoma (Format određivanja varijante) u genomu za aplikacije za određivanje varijanti.

Postupci kontrole kvaliteta

Softver instrumenta NextSeq 550Dx procenjuje svaku obradu, uzorak i određivanje baza u odnosu na pokazatelje kontrole kvaliteta. U pripremi biblioteka se preporučuje i korišćenje pozitivnih i negativnih kontrola koje takođe treba proceniti. Procenite kontrole na sledeći način:

- **Negativna kontrola (kontrola bez predložka) ili neka druga negativna kontrola** – mora dati očekivani rezultat. Ako negativna kontrola generiše rezultat različit od očekivanog, moguće je da je došlo do greške u praćenju uzorka, nepravilnog beleženja prajmera za indeksiranje ili kontaminacije.
- **Positive Control Sample (Uzorak za pozitivnu kontrolu)** – mora dati očekivani rezultat. Ako pozitivna kontrola generiše rezultat različit od očekivanog, moguće je da je došlo do greške u praćenju uzorka ili nepravilnog beleženja prajmera za indeksiranje.

Karakteristike performansi

Karakteristike performansi za instrument NextSeq 550Dx utvrđene su pomoću modula Germline Variant (Germinativna varijanta) i Somatic Variant (Somatska varijanta), kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa), a potvrđeni pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Ispitivanja su obuhvatala indeksiranje uzoraka, prenos uzoraka (carryover), DNK ulazne podatke, analitičku osetljivost (granica praznog uzorka/granica otkrivanja), tačnost, preciznost, poređenje metoda i reprodukciju.

Analitička ispitivanja pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) namenjena su za procenu tvrdnji o performansama već utvrđenim pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa). Rezultati pokazuju da kompleti reagensa (v2 i v2.5) imaju slične performanse kada se koristi komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Karakteristike performansi povezane sa predanalitičkim faktorima, poput metoda ekstrahovanja ili ometajućih (interferirajućih) supstanci, potražite u *uputstvu u pakovanju za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Definicije izračunavanja korišćenih u karakteristikama performansi

- 1 Procenat pozitivnog slaganja (Positive Percent Agreement, PPA) izračunava se kao udeo lokusa koje je referentna metoda klasifikovala kao varijante, a koje analiza tačno prijavljuje.
 - ▶ (br. lokusa varijanti koje je analiza tačno prijavila) / (ukupan br. lokusa varijanti)
Lokusi varijanti koje prijavljuje analiza i koji su u skladu sa referentnom metodom predstavljaju prave pozitivne rezultate (TP). Lokusi varijanti koje analiza prijavljuje kao određivanja referenci ili kao određivanja drugačijih varijanti predstavljaju lažno negativne rezultate (FN).
- 2 Procenat negativnog slaganja (Negative Percent Agreement, NPA) izračunava se kao udeo lokusa koje je referentna metoda klasifikovala kao divlji tip, a koje analiza tačno prijavljuje.
 - ▶ (br. lokusa divljeg tipa koje je analiza tačno prijavila) / (ukupan br. lokusa divljeg tipa)

Lokusi divljeg tipa koje prijavljuje analiza i koji su u skladu sa referentnom metodom predstavljaju prave negativne rezultate (TN). Lokusi divljeg tipa koje analiza prijavljuje kao varijante predstavljaju lažno pozitivne rezultate (FP).

- 3 Procenat ukupnog slaganja (Overall Percent Agreement, OPA) izračunava se kao udeo lokusa koje analiza pravilno prijavljuje u odnosu na referentnu metodu.
 - ▶
$$\frac{(\text{br. lokusa varijanti koje je analiza tačno prijavila}) + (\text{br. lokusa divljeg tipa koje je analiza tačno prijavila})}{(\text{ukupan br. lokusa varijanti}) + (\text{ukupan br. lokusa divljeg tipa})}$$
- 4 Izračunavanja PPA, NPA i OPA ne obuhvataju slučajeve bez određivanja (kada lokusi varijanti ili referentni lokusi ne zadovoljavaju jedan filter kvaliteta ili više njih).
- 5 Stopa određivanja autozoma se izračunava kao ukupan broj lokusa koji prolaze filtere podeljen ukupnim brojem sekvenciranih pozicija za hromosome 1–22; hromozomi X i Y su isključeni. Ovi pokazatelji ne uzimaju u obzir slaganje određivanja sa referentnom metodom.

Performanse kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa)

Indeksiranje uzoraka

Prajmeri za indeksiranje uzoraka, dodati tokom pripreme biblioteke, dodeljuju jedinstven niz svakom uzorku DNK. Ovi jedinstveni nizovi omogućavaju da više uzoraka bude objedinjeno u jednu obradu sekvenciranjem. Indeksiranje uzoraka se koristi za tokove rada za germinativne i somatske ćelije. Svrha ovog ispitivanja je bila utvrđivanje minimalnog (8) i maksimalnog (96) broja uzoraka koji se mogu obuhvatiti jednom obradom sekvenciranjem na instrumentu NextSeq 550Dx. Testirano je osam jedinstvenih uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) pomoću 12 različitih kombinacija prajmera za indeksiranje po uzorku. Rezultati uzoraka iz četiri obrade sekvenciranjem obavljene pomoću modula Germline Variant (Germinativna varijanta) upoređeni su sa verzijom Platinum Genomes (Platinasti genom) 2016-1.0.

U prvom nizu obrada, 96 jedinstveno indeksiranih biblioteka uzoraka je testirano korišćenjem reprezentativne analize namenjene za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza po lancu u sva 23 humana hromozoma. Cilj ovog dela bio je potvrđivanje sposobnosti analize da dosledno odredi genotip za dati uzorak u različitim kombinacijama prajmera za indeksiranje. U drugom nizu obrada je sekvencirano osam jedinstveno indeksiranih biblioteka uzoraka u dve obrade sekvenciranjem radi potvrde minimalnog broja podržanih indeksa.

U obradama sa 96 indeksa, PPA za SNV-ove bio je u rasponu od 98,7% do 100%, PPA za insercije i delecije bio je 100%, a NPA je bio 100% za svaku od 96 kombinacija indeksa. Obrade sa 8 indeksa imale su vrednosti PPA od 100% (SNV-ovi, insercije i delecije) i NPA od 100% za svaku od osam kombinacija indeksa.

Prenos uzoraka (carryover)

Instrument NextSeq 550Dx omogućava sekvenciranje više uzoraka i kontrole u jednoj obradi sekvenciranjem. Obavljeno je ispitivanje radi određivanja razmera prenosa uzoraka u okviru obrade sekvenciranjem (prenos u okviru obrade) i između obrada sekvenciranjem (prenos između obrada). Dva uzorka Platinum Genome (Platinasti genom), jedan muški i jedan ženski, testirana su korišćenjem reprezentativne analize namenjene za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza (150 amplikona) u 23 različita hromozoma, uključujući oba hromozoma pola. Biblioteke su sekvencirane na instrumentu NextSeq 550Dx korišćenjem modula Germline Variant (Germinativna varijanta) Uočen je prenos muških uzoraka u ženske uzorke na osnovu prisutnosti očitavanja amplikona hromozoma Y u ženskim uzorcima.

Prenos u okviru obrade može se dogoditi tokom generisanja klastera, određivanja baza u ciklusu indeksiranja i demultipleksiranja uzorka. Za testiranje prenosa uzoraka u okviru obrade sekvenciranjem, skup biblioteka koji se sastojao od po 46 replika muških i ženskih uzoraka, kao i četiri kontrole bez predloška jedanput su sekvencirani na instrumentu NextSeq 550Dx. Prenos uzoraka u okviru obrade procenjen je poređenjem pokrivenosti amplikona hromozoma Y u svakoj ženskoj replici i prosečne pokrivenosti amplikona hromozoma Y u svih muškim replikama u skupu. Uočena medijana prenosa u okviru obrade iznosila je 0,084%.

Za testiranje prenosa uzoraka između obrada pripremljena su dva skupa biblioteka i uzastopno sekvencirana na instrumentu NextSeq 550Dx. Prvi skup je sadržao 46 replika ženskog uzorka i dve kontrole bez predloška. Drugi skup je sadržao 46 replika muškog uzorka i dve kontrole bez predloška. Oba skupa su koristila iste adaptere indeksa. Ženski skup je prvi sekvenciran. Zatim je usledila obrada sekvenciranjem muškog skupa, a nakon nje je

ponovljena obrada sekvenciranjem ženskog skupa. Prenos uzoraka između obrada procenjen je poređenjem pokrivenosti amplicona hromozoma Y između odgovarajućih replika iz ponovljene obrade ženskog skupa i obrade muškog skupa. Uočena medijana prenosa između obrada iznosila je 0,0076%.

Ulazna DNK

Krv (germinativne ćelije)

Za instrument NextSeq 550Dx je određen raspon ulazne DNK iz krvi za pripremu biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i korišćenjem toka rada modula Germline Variant (Germinativna varijanta). Ovaj raspon je određen kroz ispitivanje serijskim razređivanjem u kojem je korišćeno 13 uzoraka „platinastog genoma” i reprezentativna analiza namenjena za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza u 23 različita hromozoma. Biblioteka je sekvencirana na dva instrumenta NextSeq 550Dx korišćenjem jedne serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa).

Testirano je pet duplikata uzoraka na pet nivoa ulazne DNK u rasponu od 250 ng do 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng i 12 ng). Osam uzoraka je testirano u jednoj replici na svakom od pet nivoa ulazne DNK. Radi utvrđivanja tačnosti, upoređeni su genotipi uzoraka sa „platinastim genomom” verzije 2016-1.0. Rezultati su određeni za svaki nivo ulaza. U **Tabela 1** je predstavljen PPA za svaki tip varijante (SNV-ovi, insercije i delecije); NPA je predstavljen u **Tabela 2**. Svi ulazni nivou su imali sličnu tačnost. Preporučena ulazna DNK za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx je 50 ng sa 25 ng i 100 ng, pod uslovom da su donja i gornja granica u skladu sa karakteristikama performansi.

Tabela 1 Rezultati PPA za svaku ulaznu DNK prema tipu varijante

Ulazna DNK (ng)	Tip varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez određivanja	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	Insercija	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	Delecija	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

Tabela 2 NPA za svaku ulaznu DNK

Ulazna DNK (ng)	TN	FP	Reference bez određivanja	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 (somatske ćelije)

Za instrument NextSeq 550Dx je određen raspon ulazne DNK fiksirane u formalinu i ukalupljene u parafinu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) za pripremu biblioteka pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i korišćenjem toka rada modula Somatic Variant (Somatska varijanta). Raspon ulazne DNK je određen kroz ispitivanje serijskim razređivanjem u kojem je korišćeno 3 uzorka Platinum Genome (Platinasti genom) i reprezentativna analiza namenjena za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza u 23 različita hromozoma. Nakon ekstrahovanja DNK, ćelijske linije Platinum Genome (Platinasti genom) GM12878 i GM12877 fiksirane su u formalinu i ukalupljene u parafinu. GM12878 je razređen linijom GM12877 na takav način da su frekvencije alelnih varijanti (VAF) kod 81 varijante (55 SNV-ova, 10 insercija i 16 delecija) bile blizu 0,025, 0,05 ili 0,10. Pored toga, svaki uzorak je imao 91 varijantu sa većim frekvencijama varijanti do 1,0 VAF-a. Uzorci su obrađeni u duplikatima na pet nivoa ulazne DNK sa srednjim delta kvantitativnim ciklusom (dCq) od 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 i 7,8 mereno kompletom TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Svaka biblioteka je sekvencirana na dva instrumenta NextSeq 550Dx korišćenjem jedne serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa). Radi utvrđivanja tačnosti, određivanja varijanti u uzorcima su upoređena sa verzijom Platinum Genomes (Platinasti genom) 2016-1.0. U [Tabela 3](#) je predstavljen PPA za svaki tip varijante (SNV-ovi, insercije i delecije); NPA je predstavljen u [Tabela 4](#). Preporučena ulazna DNK za varijante pri 0,05 VAF-a ili više je dCq ≤4, pri čemu 4,6 daje nižu granicu radi ispunjavanja karakteristika performansi.

Tabela 3 Rezultati PPA za svaku ulaznu DNK prema tipu varijante

Srednja vrednost dCq	Tip varijante	Očekivane varijante	Očekivani slučajevi bez određivanja	Ciljni VAF razređivanja					
				0,025		0,05		0,10	
				Varijanta bez određivanja	PPA (%)	Varijanta bez određivanja	PPA (%)	Varijanta bez određivanja	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nije primenjivo.	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	Insercija	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	Delecija	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

Tabela 4 NPA za svaku ulaznu DNK

Srednja vrednost dCq	Očekivan divlji tip	Ciljni VAF razređivanja					
		0,025		0,05		0,10	
		Reference bez određivanja	NPA (%)	Reference bez određivanja	NPA (%)	Reference bez određivanja	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

Analitička osetljivost (granica praznog uzorka [Limit of Blank, LoB] i granica otkrivanja [Limit of Detection, LoD])

Ovo ispitivanje je obavljeno radi određivanja granice praznog uzorka (LoB) i granice otkrivanja (LoD) za modul Somatic Variant (Somatska varijanta) na instrumentu NextSeq 550Dx. To je urađeno korišćenjem reprezentativne analize namenjene za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza u 23 različita hromozoma. Nakon ekstrahovanja DNK, ćelijske linije Platinum Genome (Platinasti genom) GM12878 i GM12877 fiksirane su u formalinu i ukalupljene u parafinu. GM12878 je razređen linijom GM12877 na takav način da su frekvencije varijanti kod 74 varijante (53 SNV-ova, 7 insercija i 14 delecija) bile $0,05 \pm 0,02$. GM12877 i razređena linija GM12878 (GM12878-D) testirani su tokom šest uzastopnih početnih dana na jednom instrumentu, uz zamenjivanje dve serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) u ukupno šest obrada sekvenciranjem. Ovo testiranje je dalo 60 replika za svaku varijantu u GM12878-D i 72 replike za svaku odgovarajuću koordinatu divljeg tipa u liniji GM12877 za svaku seriju reagensa. LoB i LoD su izračunati korišćenjem klasičnog pristupa navedenog u dokumentu CLSI EP17- A2 i opcije bez parametara. LoB i LoD su izračunati za SNV-ove, insercije i delecije zasebno, formiranjem skupova frekvencija varijanti za dati tip varijante. Greška tipa I je definisana kao 0,01, a greška tipa II kao 0,05.

U slučaju LoB-a, frekvencije varijanti objedinjenih u skupove sortirane su od najmanje do najveće, pa je izračunata pozicija na 99. mestu za svaku seriju reagensa za svaki tip varijante (Tabela 5). Modul Somatic Variant (Modul somatske varijante) koristi graničnu vrednost (efektivna LoB) 0,026 VAF-a za otkrivanje kvalitativnog prepoznavanja varijanti. Izračunata LoB potvrdila je da ta granična vrednost dovodi do greške tipa I od maksimalno 0,01.

Tabela 5 Granica praznog uzorka

Tip varijante	Ukupan broj osmatranja	Serijski reagens za LoB 1 (%)	Serijski reagens za LoB 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insercija	504	0,56	0,56
Delecija	1008	1,20	1,20

U slučaju LoD-a, izračunat je procenat frekvencije pojedinačnih mutacija za svaku seriju reagensa za svaki tip varijante ispod granične vrednosti od 0,026 (Tabela 6). Pošto su procenti bili manji od greške tipa II koja iznosi 5% (0,05), medijana kombinovanih frekvencija varijanti izračunata je kao LoD (Tabela 6). Kao LoD za svaki tip varijante je uzeta veća od dve vrednosti izračunate za dve serije reagensa – 4,97% za SNV, 5,12% za insercije i 5,26% za delecije.

Tabela 6 Granica otkrivanja

Serijska reagensna	Tip varijante	Ukupan broj osmatranja	Br. merenja VAF-a <2,6%	% merenja VAF-a <2,6%	Granica otkrivanja (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insercija	420	6	1,4	5,08
	Delecija	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insercija	420	5	1,2	5,12
	Delecija	840	7	0,80	5,26

Tačnost

Germinativne ćelije

Sledeće ispitivanje je obavljeno radi procene tačnosti određivanja varijanti modula Germline Variant (Germinativna varijanta) na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa). Testirano je 13 jedinstvenih uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) pomoću reprezentativne analize namenjene za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza (150 amplikona) u 23 različita hromozoma. Obavljeno je ukupno devet obrada na tri instrumenta za sekvenciranje, sa tri serije reagensa i tri laboranta tokom pet početnih dana. Tačnost je određena za SNV varijante (varijante sa jednim nukleotidom), insercije i delecije upoređivanjem rezultata sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita, pomoću verzije Platinum Genomes (Platinasti genom) 2016-1.0. Pouzdani genomski regioni su definisani na osnovu ove referentne metode, ako nije navedeno drugačije.

Tabela 7 Rezime slaganja za germinativne ćelije

Kriterijumi	Ukupan broj osmatranja ¹	Rezultat prema osmatranju ²	Rezultat prema obradi ³
PPA za SNV	819	98,7	>99,9
PPA za insercije	819	95,0	98,9
PPA za delecije	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Izračunato kao broj uzoraka po obradi (91) x broj obrada (9) = 819.

²Najniža uočena vrednost po replici uzorka za svih 9 obrada.

³Najmanja vrednost kada se podaci iz svake obrade objedinjeno analiziraju.

Tabela 8 sadrži podatke dobijene ispitivanjem predstavljene uz procenat pozitivnog i negativnog slaganja za svaki uzorak, pri čemu se rezultati za varijante upoređuju sa Platinum Genomes (Platinasti genom) verzije 2016- 1.0 za izračunavanja PPA. Kombinuju se tri tipa varijanti (SNV, insercije i delecije). Referentna metoda pruža rezultate samo za jednonukleotidne varijante i insercije/delecije, rezultati sa bazama izvan varijanti se upoređuju sa međuverzijom referentnog niza humanog genoma hg19 za izračunavanja NPA.

Tabela 8 Slaganje za germinativne ćelije prema uzorku

Uzorak	Srednja stopa određivanja	Očekivane varijante ¹	TP	FN	Varijanta bez određivanja	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

Uzorak	Srednja stopa određivanja	Očekivane varijante ¹	TP	FN	Varijanta bez određivanja	TN	FP	PPA	NPA	OPA
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 Ukupan broj varijanti u svim replikama uzorka u 9 obrada.

Tabela 9 sadrži podatke ispitivanja predstavljene prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante upoređuju sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita. Otkrivanje se procenjuje posebno za svaki tip varijante – SNV-ove, insercije i delecije. Referentne pozicije se ne računaju.

Tabela 9 Slaganje za germinativne ćelije prema uzorku i tipu varijante

>Uzorak	SNV			Insercije			Delecije		
	>Očekivano	>TP	>FN	>Očekivano	>TP	>FN	Očekivano	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

Uzorci su dodatno analizirani radi određivanja malih insercija i delecija (indela). Ukupan rezime je predstavljen u Tabela 10. Pronađen je ukupno 71 indel različite veličine: 1–24 bp za insercije i 1–25 bp za delecije.

Tabela 10 Rezime otkrivanja indela za germinativne ćelije

Tip varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez određivanja	PPA
Insercija	18522	18018	27	477	99,9
Delecija	17388	17073	0	315	100

Reprezentativna analiza se sastojala od 150 amplikona čija je namena pokrivanje različitih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona je imao raspon od 0,19 do 0,87. Amplikoni su imali i raspon od jednonukleotidnih (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. Podaci su prikupljeni za svaki amplikon zasebno (Tabela 11) radi utvrđivanja uticaja genomske sadržaja na procenat tačnih određivanja. Procenat tačnih određivanja se sastoji od određivanja varijanti i referentnih određivanja i iznosi manje od 100% ako ima netačnih određivanja ili nema određivanja.

Tabela 11 Tačnost za germinativne ćelije na nivou amplikona

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primenljivo	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

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Nije primenljivo	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

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primenljivo	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primenljivo	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,42	69615	0	0	100

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,36	74529	0	0	100

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Nije primenljivo	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Nije primenljivo	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primenljivo	0,68	60605	1	0	100

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primenljivo	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Nije primenljivo	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primenljivo	0,55	0	0	0	Nije primenljivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primenljivo	0,48	0	0	0	Nije primenljivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nije primenljivo

Rezultati sekvenciranja za uzorak NA12878 upoređeni su sa veoma pouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (National Institute of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona, njih 92 je bilo sasvim sadržano u veoma pouzdanim genomskim regionima, 41 amplikon je imao delimična preklapanja, a 17 amplikona nije imalo preklapanja sa NIST nizom. Ovaj ishod je doveo do 10.000 koordinata po replici za poređenje. Određivanja baza izvan varijanti su upoređena sa međuverzijom hg19 referentnog niza humanog genoma. Rezultati tačnosti su prikazani u [Tabela 12](#).

Tabela 12 Slaganje za germinativne ćelije za uzorak NA12878 sa NIST bazom podataka

Uzorak	Br. amplikona	Srednja stopa određivanja	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Na osnovu podataka dobijenih ovim ispitivanjem germinativnih hromozoma u devet obrada, instrument NextSeq 550Dx može dosledno da sekvencira sledeće:

- ▶ sadržaj GC $\geq 19\%$ (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona sa 19% sadržaja GC su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,6%)
- ▶ sadržaj GC $\leq 87\%$ (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona sa 87% sadržaja GC su tačno određene uz nula slučajeva bez određivanja)
- ▶ dužine PolyA ≤ 9 (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyA devet nukleotida su tačno određene uz nula slučajeva bez određivanja)
- ▶ dužine PolyT ≤ 10 (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyT deset nukleotida su tačno određene uz nula slučajeva bez određivanja)
- ▶ dužine PolyG ≤ 7 (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyG sedam nukleotida su tačno određene uz stopu bez određivanja od 1,0%)
- ▶ dužine PolyC ≤ 6 (sve određene baze u 2457 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyC šest nukleotida su tačno određene uz nula slučajeva bez određivanja)
- ▶ dužine dinukleotidnih ponavljanja $\leq 11x$ (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže dinukleotidno ponavljanje 11x su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,5%)
- ▶ dužine trinukleotidnih ponavljanja $\leq 5x$ (sve određene baze u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže trinukleotidno ponavljanje 5x su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,5%)
- ▶ dužine insercija ≤ 24 (66343 od 66370 određenih baza u 819 sekvenciranih amplikona koji sadrže 24-nukleotidnu inserciju su tačno određene uz stopu bez određivanja od 1,2%; nije bilo netačnih određivanja u regionu koji sadrži 24-nukleotidnu inserciju)
- ▶ dužine delecije ≤ 25 (sve određene baze u 2457 sekvenciranih amplikona koji sadrže 25-nukleotidnu deleciju su tačno određene uz nula slučajeva bez određivanja)

Somatske ćelije

Ovde opisano ispitivanje je korišćeno za procenu tačnosti određivanja varijanti modula Somatic Variant (Somatska varijanta) na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa).

U ispitivanju je korišćena reprezentativna analiza namenjena za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza (150 amplikona) u 23 različita hromozoma. DNK Platinum Genome (Platinasti genom) je ekstrahovana iz blokova tretiranih FFPE-om radi generisanja šest jedinstvenih uzoraka za proučavanje tokom ispitivanja.

Uzorak DNK GM12877 je razređen uzorkom DNK GM12878 radi stvaranja uzoraka GM12877-D5 i GM12877-D7 kao skupova jedinstvenih heterozigotnih varijanti sa frekvencijama varijanti koje iznose oko 5% i 7%. Uzorak DNK GM12878 je na sličan način razređen uzorkom DNK GM12877 radi stvaranja uzoraka GM12878-D5 i GM12878-D7. Svaki od tih uzoraka je testiran u tri primerka, osim razređenih uzoraka koji su testirani u šest replika. Obavljeno je ukupno devet obrada na tri instrumenta za sekvenciranje, sa tri serije reagensa i tri laboranta tokom pet početnih dana. Tačnost je određena za SNV varijante (varijante sa jednim nukleotidom), insercije i delecije upoređivanjem rezultata sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita, pomoću verzije Platinum Genomes (Platinasti genom) 2016-1.0. Pouzdani genomski regioni su definisani na osnovu ove referentne metode, ako nije navedeno drugačije.

Tabela 13 Rezime slaganja za somatske ćelije

Kriterijumi	Ukupan broj osmatranja ¹	Rezultat prema osmatranju ²	Rezultat prema obradi ³
PPA za SNV	378	98,9	99,9
PPA za insercije	378	96,9	99,9
PPA za delecije	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Izračunato kao broj uzoraka po obradi (42) x broj obrada (9) = 378.

²Najniža uočena vrednost po replici uzorka za svih 9 obrada.

³Najmanja vrednost kada se podaci iz svake obrade objedinjeno analiziraju.

Tabela 14 sadrži podatke dobijene ispitivanjem predstavljene uz procenat pozitivnog i negativnog slaganja za svaki uzorak, pri čemu se rezultati za varijante upoređuju sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita za izračunavanja PPA. Kombinuju se tri tipa varijanti (SNV, insercije i delecije). Referentna metoda pruža rezultate samo za jednonukleotidne varijante i insercije/delecije, rezultati sa bazama izvan varijanti se upoređuju sa međuverzijom referentnog niza humanog genoma hg19 za izračunavanja NPA.

Tabela 14 Slaganje za somatske ćelije prema uzorku

Uzorak	Srednja stopa određivanja	Očekivano	TP	FN	Varijanta bez određivanja	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

Tabela 15 sadrži podatke ispitivanja predstavljene prema uzorku, pri čemu se rezultati za varijante upoređuju sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita. Otkrivanje se procenjuje posebno za svaki tip varijante – SNV-ove, insercije i delecije. Referentne pozicije se ne računaju.

Tabela 15 Slaganje za somatske ćelije prema uzorku i tipu varijante

Uzorak	SNV			Insercije			Delecije		
	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN	Očekivano	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

Uzorak	SNV			Insercije			Delecije		
	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN	Očekivano	TP	FN
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

10 uzoraka je dodatno analizirano radi određivanja malih insercija i delecija (indela) (Tabela 16). Pronađen je ukupno 71 indel različite veličine: 1–24 bp za insercije i 1–25 bp za delecije.

Tabela 16 Rezime otkrivanja indela za somatske ćelije

Tip varijante	Očekivane varijante	TP	FN	Varijanta bez određivanja	PPA
Insercija	10773	10282	9	482	99,2
Delecija	11502	10667	5	830	>99,9

Izrađeno je 150 amplikona čija je namena pokrivanje različitih genomskih sadržaja. GC sadržaj amplikona je imao raspon od 0,19 do 0,87%. Amplikoni su imali i raspon od jednonukleotidnih (npr. PolyA, PolyT), dinukleotidnih i trinukleotidnih ponavljanja. Podaci su prikupljeni za svaki amplikon zasebno (Tabela 17) radi utvrđivanja uticaja genomskog sadržaja na procenat tačnih određivanja. Procenat tačnih određivanja se sastoji od određivanja varijanti i referentnih određivanja i iznosi manje od 100% ako ima netačnih određivanja ili nema određivanja.

Tabela 17 Tačnost za somatske ćelije na nivou amplikona

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Nije primenljivo	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Nije primenljivo	0,44	27575	0	28	99,9

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Nije primenljivo	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Nije primenljivo	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Nije primenljivo	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
69	11	47470345	47470444	100	100	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Nije primenljivo	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

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Nije primenljivo	0,37	34386	0	12	>99,9

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Nije primenljivo	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Nije primenljivo	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Nije primenljivo	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Nije primenljivo	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Nije primenljivo	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	Nije primenljivo	0,6	37398	0	24	99,9

Amplikon	Hromozom	Početak amplikona	Kraj amplikona	Veličina analiziranog fragmenta	Baze u pouzdanim regionima	Amplikonski genomski sadržaj	GC sadržaj	Tačna određivanja	Netačna određivanja	Bez određivanja	% tačnih određivanja
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	Nije primenljivo	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Nije primenljivo	0,55	0	0	0	Nije primenljivo
149	Y	2655519	2655609	91	0	Nije primenljivo	0,48	0	0	0	Nije primenljivo
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Nije primenljivo

Rezultati sekvenciranja za uzorak GM12878 upoređeni su sa veoma pouzdanim genotipom za NA12878 koji je uspostavio američki Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (National Institute of Standards and Technology, NIST) (v.2.19). Od 150 amplikona, njih 92 je bilo sasvim sadržano u veoma pouzdanim genomskim regionima, 41 amplikon je imao delimična preklapanja, a 17 amplikona nije imalo preklapanja sa NIST nizom. Ovaj ishod je doveo do 10.000 koordinata po replici za poređenje. Određivanja baza izvan varijanti su upoređena sa međuverzijom hg19 referentnog niza humanog genoma. Rezultati tačnosti su prikazani u [Tabela 18](#).

Tabela 18 Slaganje za somatske ćelije za uzorak GM12878 sa NIST bazom podataka

Uzorak	Br. amplikona	Srednja stopa određivanja	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Na osnovu podataka dobijenih ovim ispitivanjem somatskih hromozoma u devet obrada, instrument NextSeq 550Dx može dosledno da sekvencira sledeće:

- ▶ sadržaj GC $\geq 19\%$ (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona sa 19% sadržaja GC su tačno određene uz stopu bez određivanja od 2,6%)
- ▶ sadržaj GC $\leq 87\%$ (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona sa 87% sadržaja GC su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,6%)
- ▶ dužine PolyA ≤ 9 (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyA devet nukleotida su tačno određene uz stopu bez određivanja od 2,5%)
- ▶ dužine PolyT ≤ 10 (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyT deset nukleotida su tačno određene uz stopu bez određivanja manjom od 0,1%)
- ▶ dužine PolyG ≤ 6 (sve određene baze u 2268 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyG šest nukleotida su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,5%)
- ▶ dužine PolyC ≤ 6 (sve određene baze u 756 sekvenciranih amplikona koji sadrže ponavljanje PolyC šest nukleotida su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,4%)
- ▶ dužine dinukleotidnih ponavljanja $\leq 4x$ (sve određene baze u 1890 sekvenciranih amplikona koji sadrže dinukleotidno ponavljanje 4x su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,9%)
- ▶ dužine trinukleotidnih ponavljanja $\leq 5x$ (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže trinukleotidno ponavljanje 5x su tačno određene uz stopu bez određivanja od 1,4%)
- ▶ dužine insercija ≤ 23 (sve određene baze u 378 sekvenciranih amplikona koji sadrže 23-nukleotidnu inserciju su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,8%)
- ▶ dužine delecije ≤ 25 (sve određene baze u 1134 sekvencirana amplikona koja sadrže 25-nukleotidnu deleciju su tačno određene uz stopu bez određivanja od 0,7%)

Preciznost

Preciznost instrumenta NextSeq 550Dx određena je testiranjem 13 jedinstvenih uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) primenom tri instrumenta, tri serije reagensa i tri laboranta, pri čemu je generisano devet obrada sekvenciranjem tokom pet početnih dana. Reprezentativna analiza, uzorci i referentna metoda isti su kao što je opisano za ispitivanje tačnosti germinativnih ćelija. Doprinosi preciznosti su utvrđeni analizom komponenti varijanse, pri čemu je VAF korišćen kao promenljiva odziva i izračunate su standardne devijacije na nivou komponente za instrument, seriju reagensa, laboranta i početni dan ([Tabela 19](#)). Ukupan broj osmatranja korišćenih u analizi svake komponente varijabilnosti instrumenta, laboranta ili serije reagensa bio je 699, 176 i 235 za SNV-ove, insercije i delecije, tim redosledom.

Tabela 19 Rezultati preciznosti za instrument NextSeq 550Dx (standardna devijacija)

Komponenta	Tip varijante	Komponenta standardne devijacije		Ukupna standardna devijacija	
		Maks.	Medijana	Maks.	Medijana
Serija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insercija	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Delecija	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insercija	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Delecija	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Laborant	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insercija	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Delecija	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dan	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insercija	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Delecija	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Poređenje metoda (platforma za sekvenciranje)

Uzorci pune krvi i FFPE uzorci su analizirani na instrumentima NextSeq 550Dx i MiSeqDx pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx za tok rada sa germinativnim i somatskim ćelijama. Slaganje frekvencije varijanti za uzorke krvi i FFPE uzorke je procenjeno primenom više reprezentativnih analiza. Slika 2 prikazuje korelaciju VAF-a između dva instrumenata za jednu reprezentativnu analizu, dok Tabela 20 prikazuje rezime te korelacije prema panelu analize. Na osnovu jake korelacije između instrumenata MiSeqDx i NextSeq 550Dx, utvrđeno je da su karakteristike performansi koje se odnose na predanalitičke faktore (npr. metoda ekstrakovanja ili interferirajuće supstance) primenljive na oba instrumenta. Dodatne pojedinosti potražite u uputstvu u pakovanju za komplet TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Slika 2 Korelacija VAF-a za instrumente MiSeqDx i NextSeq 550Dx za FFPE uzorke (levo) i uzorke krvi (desno) uz korišćenje analize 1

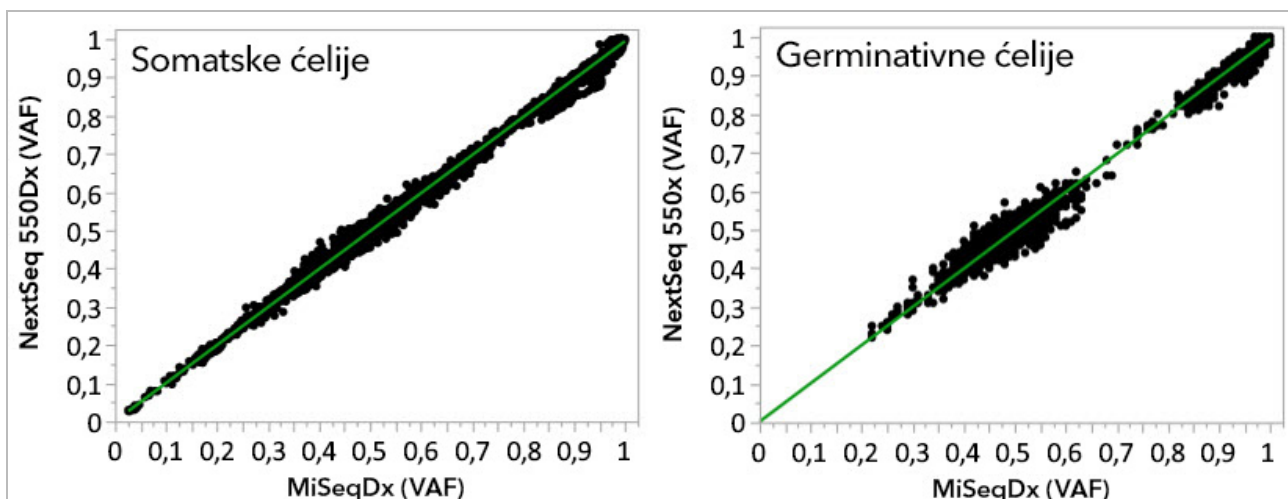


Tabela 20 Rezultati poređenja metoda korišćenjem jedinstvenih uzoraka krvi i FFPE uzoraka

Izvor gDNK	Analiza (panel oligonukleotida)	Biološke replike (uzorci)	Tehničke replike (po uzorku)	Osmatranja (br. varijanti)	Nagib	Odsečak	Korelacija (R ²)
Krv	Analiza 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Krv	Analiza 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analiza 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Analiza 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Uklonjene su dve tačke podataka na osnovu navedenog ograničenja za modul Germline Variant (Germinativna varijanta).

²Koeficijent određivanja za prikaze VAF-a kao što prikazuje slika 2.

Reprodukcija

Reprodukcija je na instrumentu NextSeq 550Dx procenjena pomoću uzoraka Somatska varijanta (Platinasti genom) i reprezentativne analize namenjene za ispitivanje različitih gena koji obuhvataju 12.588 baza u 23 različita hromozoma, pomoću 150 amplikona. Testiranje germinativnih ćelija se sastojalo od sedam replika 13 uzoraka; testiranje somatskih ćelija se sastojalo od šest replika sedam uzoraka sa različitim nivoima VAF-a. Uzorci su pripremljeni pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testiranje je obavljeno na tri spoljne lokacije korišćenjem jedne serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa). Na svakoj lokaciji je korišćen jedan instrument NextSeq 550Dx. Testiranje su na svakoj lokaciji obavljala dva laboranta. Svaki laborant je obavljao testiranje svakog tipa uzorka tokom tri dana koja nisu uzastopna, u ukupno 36 obrada na sve tri lokacije. Ovo testiranje je dovelo do 18 obrada za svaki tok rada za germinativne i somatske ćelije.

Germinativne ćelije

Varijante germinativnih ćelija sa nivoom VAF-a $\geq 0,2$ prijavljene su kao pozitivne (varijante). Za očekivane pozitivne varijante germinativnih ćelija, podaci su procenjeni za stopu bez određivanja i stopu tačnih pozitivnih određivanja u svakom tipu varijante (SNV, insercija, delecija). Tabela 21 prikazuje rezime uočenih stopa, kao i donju i gornju granicu pouzdanosti od 95% (LCL/UCL) izračunatu pomoću Vilsonove metode za svaki tip varijante.

Tabela 21 Osmatranja pri određivanju varijanti za germinativne ćelije za očekivane pozitivne rezultate prema tipu varijante

Tip varijante	Bez određivanja			Tačno pozitivno određivanje				
	Uočeno	Ukupno	Procenat	Uočeno	Ukupno	Procenat	95% LCL	95% UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Insercije	1.026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Delecije	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Varijante germinativnih ćelija sa nivoom VAF-a $< 0,2$ prijavljene su kao negativne (divlji tip). Za očekivane negativne lokacije na germinativnim ćelijama, podaci su procenjeni za stopu bez određivanja i stopu tačnih određivanja divljeg tipa. Tabela 22 prikazuje rezime uočenih stopa, kao i donju i gornju granicu pouzdanosti od 95% (LCL/UCL) izračunatu pomoću Vilsonove metode.

Tabela 22 Osmatranja pri određivanju varijanti za germinativne ćelije za očekivane negativne rezultate

Tip varijante	Bez određivanja			Tačno negativno određivanje				
	Uočeno	Ukupno	Procenat	Uočeno	Ukupno	Procenat	95% LCL	95% UCL
Divlji tip	4.883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Varijante germinativnih ćelija sa nivoom VAF-a $\geq 0,2$ i $< 0,7$ određuju se kao pozitivne heterozigotne za varijantu, a varijante sa nivoom VAF-a $\geq 0,7$ određuju se kao pozitivne homozigotne za varijantu. Korišćeni su uzorci germinativnih ćelija sa heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo da li inherentna varijabilnost analize može uticati na određivanje genotipa. Utvrđena je vrednost Cx za obe granične vrednosti (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udeo ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. Za donju graničnu vrednost od 0,2 VAF-a, Cx je iznosio $\geq 99,999\%$, što znači da bi $\geq 99,999\%$ heterozigotnih varijanti bilo određeno kao heterozigotno. U odnosu na gornju graničnu vrednost od 0,7 VAF-a, Cx je iznosio $\leq 0,001\%$, što upućuje na to da bi $\leq 0,001\%$ heterozigotnih varijanti bilo određeno kao homozigotno. **Tabela 23** prikazuje rezime rezultata prema tipu varijante.

Varijante germinativnih ćelija sa nivoom VAF-a $\geq 0,2$ i $< 0,7$ određuju se kao pozitivne heterozigotne za varijantu, a varijante sa nivoom VAF-a $\geq 0,7$ određuju se kao pozitivne homozigotne za varijantu. Korišćeni su uzorci germinativnih ćelija sa heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo da li inherentna varijabilnost analize može uticati na određivanje genotipa. Utvrđena je vrednost Cx za obe granične vrednosti (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udeo ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. U odnosu na donju graničnu vrednost od 0,2 VAF-a, Cx je iznosio $\geq 99,999\%$, što znači da bi $\geq 99,999\%$ heterozigotnih varijanti bilo određeno kao heterozigotno. Za gornju graničnu vrednost od 0,7 VAF-a, Cx je iznosio $\leq 0,001\%$, što upućuje na to da bi $\leq 0,001\%$ heterozigotnih varijanti bilo određeno kao homozigotne varijante. **Tabela 23** prikazuje rezime rezultata prema tipu varijante.

Tabela 23 Vrednosti Cx za germinativne ćelije za heterozigotne varijante

Tip varijante	Granična vrednost pri 0,2 VAF-a	Granična vrednost pri 0,7 VAF-a
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insercije	24/24	24/24
Delecije	35/35	35/35
Ukupno	153	153

Somatske ćelije

Varijante somatskih ćelija sa nivoima VAF-a $\geq 0,026$ prijavljuju se kao pozitivne (varijanta). Za potrebe ove analize, osmatranja sa nivoima VAF-a $\geq 0,01$ i $< 0,026$ su se smatrala višeznačnim (ni pozitivna ni negativna, označena kao varijante niske frekvencije). Da bi se ocenile performanse, rezultati su računati na tri načina:

- ▶ najbolji slučaj: svaki višeznačan rezultat se smatra tačnim pozitivnim određivanjem (slaganje sa očekivanim rezultatima)
- ▶ najgori slučaj: svaki višeznačan rezultat se smatra netačnim određivanjem (neslaganje sa očekivanim rezultatima)
- ▶ slučaj isključivanja: svaki višeznačan rezultat se isključuje iz analize

Tri tabele, **Tabela 24**, **Tabela 25** i **Tabela 26**, prikazuju rezime rezultata određivanja za najbolji slučaj, najgori slučaj i slučaj isključivanja, tim redosledom, zajedno sa donjim i gornjim nivoom pouzdanosti od 95% (LCL/UCL) izračunatim primenom Vilsonove metode.

Tabela 24 Osmatranja pri određivanju varijanti za somatske ćelije za očekivane pozitivne rezultate prema tipu varijante (najbolji slučaj)

Tip varijante	Tačno pozitivno određivanje				
	Uočeno	Ukupno	Procenat	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabela 25 Osmatranja pri određivanju varijanti za somatske ćelije za očekivane pozitivne rezultate prema tipu varijante (najgori slučaj)

Tip varijante	Tačno pozitivno određivanje				
	Uočeno	Ukupno	Procenat	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabela 26 Osmatranja pri određivanju varijanti za somatske ćelije za očekivane pozitivne rezultate prema tipu varijante (uklonjena višeznačna određivanja)

Tip varijante	Tačno pozitivno određivanje				
	Uočeno	Ukupno	Procenat	95% LCL	95% UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insercije	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Delecije	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Varijante somatskih ćelija sa nivoom VAF-a $<0,01$ prijavljuju se kao negativna otkrivanja (divlji tip). Za očekivane negativne lokacije na somatskim ćelijama, podaci su procenjeni za stopu bez određivanja i stopu tačnih određivanja divljeg tipa. Tačna određivanja divljeg tipa određena su isključivanjem slučajeva bez prepoznavanja i oduzimanjem uočenih određivanja koja spadaju u zonu višeznačnosti (nivoa VAF-a $\geq 0,01$ i $<0,026$), kao i netačnih određivanja koja su bila iznad granične vrednosti (nivoa VAF-a $\geq 0,026$) iz ukupnog broja. Tabela 27 prikazuje rezime uočenih, ukupnih i procentualnih rezultata za negativne somatske lokacije za stopu bez određivanja i stopu tačnog određivanja divljeg tipa, zajedno sa donjim i gornjim nivoom pouzdanosti od 95% (LCL/UCL) izračunatim primenom Vilsonove metode.

Tabela 27 Osmatranja pri određivanju varijanti za somatske ćelije za očekivane negativne rezultate

Tip varijante	Bez određivanja			Tačna određivanja						
	Uočeno	Ukupno	Pro-cenat	Višeznačno	Netačno	Tačno	Ukupno	Pro-cenat	95% LCL	95% UCL
Divlji tip	36.326	8.909.676	0,408	2.254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Procenjeni su somatski uzorci sa različitim nivoima VAF-a za istu varijantu radi određivanja vrednosti C95 za analizu (u svakom tipu varijante). Da bi se procenila varijabilnost blizu granične vrednosti analize, korišćeni su uzorci sa očekivanim nivoima VAF-a između 0,02 i 0,07. Određena je vrednost C95 za svaku varijantu, a najveće vrednosti C95 za svaki tip varijante navedene su u Tabela 28.

Tabela 28 Rezime C95 za somatske ćelije

Tip varijante	N	C95
SNV	74	0,0613
Insercija	24	0,0573
Delecija	33	0,0575

Performanse kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa)

Pregled

Instrument NextSeq 550Dx podržavaju dva kompleta reagensa: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa) i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa). Da bi se pokazalo da komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) ispunjava uslove analitičkih performansi potvrđene i verifikovane kompletom reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa), obavljena su ispitivanja pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Obavljene su dve pripreme biblioteka pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx: jedna sa tokom rada za germinativne ćelije, a druga sa tokom rada za somatske ćelije. Biblioteke iz svakog toka rada su testirane pomoću tri serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) na tri instrumenta NextSeq 550Dx. Pored toga, testiranje za svaki tok rada je obuhvatalo jednu obradu pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa).

Analitička osetljivost (granica praznog uzorka [Limit of Blank, LoB] i granica otkrivanja [Limit of Detection, LoD])

Verifikacija kompletom reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) je pokazala da instrument NextSeq 550Dx može da otkrije varijante pri 0,05 VAF-a sa greškom tipa II $\leq 0,05$, a da granična vrednost od 0,026 VAF-a koju koristi modul Somatic Variant (Somatska varijanta) (efektivna LoB) podržava grešku tipa I $\leq 0,01$. Na osnovu tih saznanja se očekuje da je varijanta pri 0,05 VAF-a veća od ili jednaka 0,026 VAF-a u 95% slučajeva, a da je pozicija divljeg tipa manja od 0,026 VAF-a u 99% slučajeva. Da bi se obezbedilo da su ova saznanja ispunjena kada se koristi komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa), obavljena su ponovljena merenja na instrumentu NextSeq 550Dx sa uzorcima divljeg tipa (LoB uzorci) i uzorcima koji sadrže varijante pri 0,05 VAF-a (LoD uzorci) uz korišćenje kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Udeo određivanja varijanti iznad i ispod granične vrednosti od 0,026 je zatim upoređen sa rezultatima dobijenim korišćenjem kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa).

Testiranje je obuhvatalo dva LoD uzorka sa jedinstvenim skupom varijanti ciljanih na 0,05 VAF-a i odgovarajuće LoB uzorke divljeg tipa za ciljane varijante. Za pripremu biblioteka, LoD i LoB uzorci su bili obrađeni u replikama od osam i sedam, tim redosledom, pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteke su prvobitno sekvencirane pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) radi identifikovanja varijanti/genomskih koordinata za LoB/LoD procenu pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Sve varijante sa prosečnim VAF-om između 0,045 i 0,055 (LoD varijante) zasnovane na rezultatima dobijenim korišćenjem kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) korišćene su za LoD analizu (N = 51 varijanta). Prilikom LoB analize je procenjena 51 odgovarajuća genomsko koordinata.

Za procenu kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa), biblioteke su sekvencirane u tri obrade tokom tri uzastopna dana pomoću istog instrumenta i serije kompleta reagensa. Ovo testiranje je obuhvatalo 24 replike za svaku od 51 LoD varijante i 21 repliku za svaku odgovarajuću poziciju divljeg tipa. Udeo određivanja divljeg tipa sa VAF-om $< 0,026$ naveden je u [Tabela 29](#). Udeo određivanja LoD varijanti sa VAF-om većim od ili jednakim 0,026 naveden je u [Tabela 30](#).

Tabela 29 Udeo određivanja $< 0,026$ za pozicije divljeg tipa (procena očekivanog LoB-a)

Tip varijante	Procenjene pozicije	Ukupan broj osmatranja	Br. merenja VAF-a $\geq 2,6\%$	Udeo $< 2,6\%$	Udeo intervala pouzdanosti od 95%
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Insercija	11	231	0	1	0,984 – 1
Delecija	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabela 30 Udeo određivanja $\geq 0,026$ VAF-a za LoD varijante (procena očekivanog LoD-a)

Tip varijante	Procenjene pozicije	Ukupan broj osmatranja	Br. merenja VAF-a <2,6%	Br. merenja VAF-a $\geq 2,6\%$	Udeo $\geq 2,6\%$	Udeo intervala pouzdanosti od 95%
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Insercija	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Delecija	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

Tačnost

Germinativne ćelije

Sledeće ispitivanje je obavljeno radi procene tačnosti određivanja varijanti modula Germline Variant (Germinativna varijanta) pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Testirano je 12 jedinstvenih uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) pomoću reprezentativne analize. Obavljeno je ukupno 11 obrada na tri instrumenta NextSeq 550Dx i tri kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).

Tačnost je određena za SNV varijante (varijante sa jednim nukleotidom), insercije i delecije upoređivanjem rezultata sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita, Platinum Genome (Platinasti genom) 2016-1.0. Rezultati tačnosti jedne obrade sekvenciranjem sa kompletom reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) navedeni su kao referenca. Rezime rezultata je naveden u [Tabela 31](#).

Tabela 31 Rezime slaganja za germinativne ćelije

Kriterijumi	Ukupan broj osmatranja (v2.5) ¹	Rezultat prema osmatranju (v2.5) ²	Rezultat prema osmatranju (v2) ³	Rezultat prema obradi (v2.5) ⁴	Rezultat prema obradi (v2) ⁴
PPA za SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA za insercije	1056	100	100	100	98,9
PPA za delecije	1056	95,2	95,2	>99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Izračunato kao broj uzoraka po obradi x broj obrada (96 uzoraka po obradi x 11 obrada = 1056 osmatranja).

²Najniža uočena vrednost po replici uzorka za sve obrade (na osnovu 11 obrada pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5).

³Najniža uočena vrednost po replici uzorka za 1 obradu (ukupno 96 osmatranja).

⁴Najmanja vrednost kada se podaci iz svake obrade objedinjeno analiziraju.

Somatske ćelije

Sledeće ispitivanje je obavljeno radi procene tačnosti određivanja varijanti modula Somatic Variant (Somatska varijanta) na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa). Deset FFPE uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) (dva sa varijantama razređenim na 0,05 VAF) je testirano korišćenjem reprezentativne analize. Obavljeno je ukupno 11 obrada na tri instrumenta NextSeq 550Dx i tri serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).

Tačnost je određena za SNV varijante (varijante sa jednim nukleotidom), insercije i delecije upoređivanjem rezultata sa referentnom metodom dobro okarakterisanog kompozita, pomoću verzije Platinum Genome (Platinasti genom) 2016-1.0. Rezultati tačnosti jedne obrade sekvenciranjem sa kompletom reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) navedeni su kao referenca. Rezime rezultata je naveden u [Tabela 32](#).

Tabela 32 Rezime slaganja za somatske ćelije

Kriterijumi	Ukupan broj osmatranja (v2.5) ¹	Rezultat prema osmatranju (v2.5) ²	Rezultat prema osmatranju (v2) ³	Rezultat prema obradi (v2.5) ⁴	Rezultat prema obradi (v2) ⁴
PPA za SNV	528	100	100	100	100
PPA za insercije	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9
PPA za delecije	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

¹Izračunato kao broj uzoraka po obradi x broj obrada (48 uzoraka po obradi x 11 obrada = 528 osmatranja).

²Najniža uočena vrednost po replici uzorka za sve obrade (na osnovu 11 obrada pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5).

³Najniža uočena vrednost po replici uzorka za 1 obradu (ukupno 96 osmatranja).

⁴Najmanja vrednost kada se podaci iz svake obrade objedinjeno analiziraju.

Preciznost

Germinativne ćelije

Preciznost kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) sa modulom Germline Variant (Germinativna varijanta) određena je pomoću uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) i reprezentativne analize. Testiranje se sastojalo od pripreme jedne biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i obuhvatalo je obradu 12 uzoraka, svaki sa osam replika. Biblioteke su sekvencirane pomoću tri serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) i tri instrumenta NextSeq 550Dx radi ukupno devet obrada sekvenciranjem.

Korišćeni su uzorci sa heterozigotnim varijantama da bi se utvrdilo da li inherentna varijabilnost analize može uticati na određivanje genotipa (N = 153 jedinstvene heterozigotne varijante). Utvrđena je vrednost Cx za obe granične vrednosti modula Germline Variant (0,2 za heterozigotne i 0,7 za homozigotne genotipe), pri čemu je x udeo ponovljenih testiranja u kojima je granica premašena. Za donju graničnu vrednost od 0,2 VAF-a, varijanta sa minimalnom vrednošću Cx za komplet reagensa NextSeq 550Dx v2.5 (300 ciklusa) iznosila je >99,9%, što znači da bi >99,9% heterozigotnih varijanti bilo određeno kao heterozigotne varijante. Za gornju graničnu vrednost od 0,7 VAF-a, varijanta sa maksimalnom vrednošću Cx za komplet reagensa NextSeq 550Dx v2.5 (300 ciklusa) iznosila je >1,5%, što znači da bi ≤1,5% heterozigotnih varijanti bilo određeno kao homozigotne varijante. [Tabela 33](#) prikazuje rezime rezultata prema tipu varijante. Vrednosti Cx dobijene jednom obradom sekvenciranjem pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) navedene su kao reference.

Tabela 33 Vrednosti Cx za germinativne ćelije za heterozigotne varijante

Tip varijante	N	Granična vrednost pri 0,2 VAF-a		Granična vrednost pri 0,7 VAF-a	
		Min Cx (v2.5) ¹	Min Cx (v2) ²	Max Cx (v2.5) ¹	Max Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9%	>99,9%	1,5%	1,0%
Insercije	24	100%	100%	0%	<0,1%
Delecije	35	100%	>99,9%	<0,1%	<0,1%

¹Vrednosti Cx na osnovu procena ukupne standardne devijacije iz analize komponenti varijanse.

²Vrednosti Cx na osnovu standardnih devijacija uzoraka.

Somatske ćelije

Preciznost kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) sa modulom Somatic Variant određena je pomoću FFPE uzoraka Platinum Genome (Platinasti genom) i reprezentativne analize. Testiranje se sastojalo od pripreme jedne biblioteke pomoću kompleta TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i obuhvatalo je 2 uzorka, svaki sa osam replika. Biblioteke su sekvencirane pomoću tri serije kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) i tri instrumenta NextSeq 550Dx radi ukupno devet obrada sekvenciranjem.

Somatske varijante sa očekivanim nivoima VAF-a $\leq 0,10$ VAF (N = 131 jedinstvena varijanta) korišćene su za procenu varijabilnosti instrumenta blizu granične vrednosti VAF-a za modul Somatic Variant (somatske varijante sa nivoom VAF-a $\geq 0,026$ određene su kao pozitivne za varijantu). Za svaku somatsku varijantu su određene vrednosti C95. Vrednosti C95 predstavljaju VAF za koje verovatnoća da su veći od granične vrednosti VAF-a za modul Somatic Variant iznosi 95%. Najveće vrednosti C95 prema tipu varijante navedene su u [Tabela 34](#). Rezultati C95 dobijeni jednom obradom sekvenciranjem pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) navedeni su kao reference.

Tabela 34 Rezime C95 za somatske ćelije

Tip varijante	Br. procenjenih varijanti	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insercije	24	0,062	0,061
Delecije	33	0,060	0,060

¹Vrednosti C95 na osnovu procena Total Standard Deviation (Ukupna standardna devijacija) iz analize komponenti varijanse.

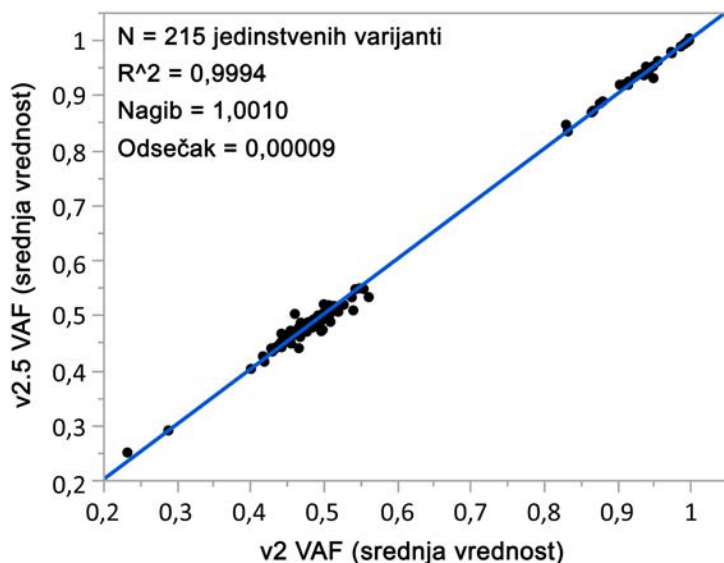
²Vrednosti C95 na osnovu Sample Standard Deviations (Standardne devijacije uzoraka).

Poređenje metoda (komplet reagensa)

Germinativne ćelije

Prosečne vrednosti VAF-a za 215 jedinstvenih varijanti utvrđene su pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) i kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) korišćenjem rezultata generisanih modulom Germline Variant (Germinativna varijanta). Prosečne vrednosti VAF-a su izračunate na osnovu 11 obrada sekvenciranjem (v2.5) i jedne obrade sekvenciranjem (v2). Barem osam replika je korišćeno za izračunavanje proseka za svaku varijantu. Na [Slika 3](#) je prikazana korelacija VAF-a između dva kompleta reagensa. Na osnovu jake linearne korelacije VAF-a i sličnosti rezultata dobijenih pomoću oba kompleta reagensa, utvrđeno je da karakteristike performansi koje su prvobitno verifikovane i potvrđene pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) sa modulom Germline Variant (Germinativna varijanta) mogu da se primene na komplet reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).

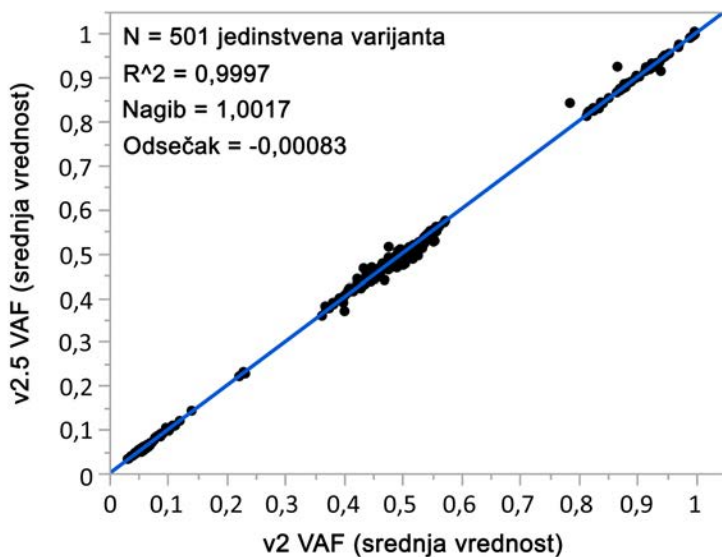
Slika 3 Korelacija frekvencije alelnih varijanti (Variant Allele Frequency, VAF) modula Germline Variant između kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) i kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).



Somatske ćelije

Prosečne vrednosti VAF-a za 501 jedinstvenu varijantu utvrđene su pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) i kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa) korišćenjem rezultata generisanih modulom Somatic Variant (Somatska varijanta). Prosečne vrednosti VAF-a su izračunate na osnovu 11 obrada sekvenciranjem (v2.5) i jedne obrade sekvenciranjem (v2). Barem tri replike su korišćene za izračunavanje proseka za svaku jedinstvenu varijantu. Na [Slika 4](#) je prikazana korelacija VAF-a između dva kompleta reagensa. Na osnovu korelacije VAF-a i sličnosti rezultata dobijenih pomoću oba kompleta reagensa, utvrđeno je da karakteristike performansi koje su verifikovane i potvrđene pomoću kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) sa modulom Somatic Variant mogu da se primene na komplet reagensu NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).

Slika 4 Korelacija frekvencije alelnih varijanti (Variant Allele Frequency, VAF) modula Somatic Variant (Somatska varijanta) između kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2 (300 ciklusa) i kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 ciklusa).



Istorija revizija

Dokument	Datum	Opis promene
Br. dokumenta 1000000030326 v06	Maj 2022.	Unete su ispravke da bi se popravio sadržaj koji je nenamerno dodat iz izvornog softvera.
Br. dokumenta 1000000030326 v05	Novembar 2021.	Dodata je izjava u odeljku „Upozorenja i mere predostrožnosti“ o prijavljivanju ozbiljnih incidenata. Dodata je izjava u odeljku „Načela postupka“ koja bliže opisuje predviđenog korisnika. Uklonjena je referenca na High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa). Dodata je referenca na High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciklusa).
Br. dokumenta 1000000030326 v04	Avgust 2021.	Dodata je tabela „Istorija revizija“. Ažurirana je adresa ovlašćenog predstavnika za EU.

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj su u vlasništvu kompanije Illumina, Inc. i njenih podružnica („Illumina”) i namenjeni su isključivo za ugovorno korišćenje njenih kupaca u vezi sa korišćenjem proizvoda koji su ovde opisani i ni za šta drugo. Ovaj dokument i njegov sadržaj ne smeju se koristiti niti distribuirati ni za koju drugu svrhu niti se smeju prenositi, otkrivati ili reprodukovati ni na koji način bez prethodnog pisanog pristanka kompanije Illumina. Illumina ne prenosi nikakvu licencu pod patentom, robnom markom, autorskim pravom ili javnim pravom niti sličnim pravima bilo kog trećeg lica prema ovom dokumentu.

Stručna i adekvatno obučena lica moraju strogo i izričito da poštuju uputstva u ovom dokumentu kako bi se obezbedila ispravna i bezbedna upotreba ovde opisanih proizvoda. Pre upotrebe tih proizvoda obavezno je u potpunosti pročitati i razumeti celokupnu sadržinu ovog dokumenta.

UKOLIKO NE PROČITATE I NE PRATITE OVO UPUTSTVO U CELOSTI, TO MOŽE DA DOVEDE DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, POVREDA LICA, KAO ŠTO SU KORISNICI ILI DRUGA LICA, I OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE I TIME ĆE SE PONIŠTITI SVAKA GARANCIJA KOJA SE ODNOSI NA PROIZVOD.

KOMPANIJA ILLUMINA NE PREUZIMA NIKAKVU ODGOVORNOST USLED NEADEKVATNE UPOTREBE OVDEOPISANIH PROIZVODA (UKLJUČUJUĆI I NJIHOVE DELOVE ILI SOFTVER).

© 2022. Illumina, Inc. Sva prava zadržana.

Svi žigovi su vlasništvo kompanije Illumina, Inc. ili odgovarajućih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Kontakt informacije



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 SAD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (van Severne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australijski sponzor

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

Oznake proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se mogu pojaviti na pakovanju i oznakama proizvoda potražite u legendi simbola za svoj komplet na veb-sajtu support.illumina.com.