

Pakningsvedlegg

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK.

Tiltenkt bruk

TruSight™ Whole Genome er en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk enhet beregnet på helgenomsekvensering og deteksjon av enkelt nukleotidvarianter, insersjoner/delesjoner, kopinummervarianter, homozygositetskjøringer, ekspansjoner med kort tandemrepetisjon og mitokondrialvariasjoner i humant genomisk DNA ekstrahert fra blod.

TruSight Whole Genome inkluderer TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes og TruSight Whole Genome Analysis Application-programvaren. Enheten er tiltenkt brukt med kompatible nedstrøms kimbaneprogrammer for å utvikle *in vitro*-diagnoseanalyser, og av kvalifisert laboratoriepersonell og analyseutviklere.

TruSight Whole Genome er tiltenkt brukt på NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Oppsummering og forklaring

TruSight Whole Genome er en neste generasjons sekvenseringsanalyse som bruker tagmenteringsbasert PCR-fri bibliotekklargjøring, med start fra genomisk DNA (gDNA) ekstrahert fra perifert fullblod, og sekvensering og primæranalyse på Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundæranalyse utføres med TruSight Whole Genome Analysis Application programvaren på inkludert og påkrevd Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx og inkluderer demultipleksing, justering til GrCh38/hg38 humant referansegenom og variantbetegnelse, samt anmerking og anvendelse av kvalitetskontroll (QC) metriske spesifikasjoner i [Tabell 1](#) for å sikre analytisk ytelse. Analyseresultatene inkluderer rapporter om kjørings- og prøve kvalitetskontroller, og genomvariantbetegnelsesformat (VCF)-filer for bruk med kompatibel nedstrøms tertiær analyse- og rapporteringsprogramvare.

TruSight Whole Genome vurderer bredt genomiske varianter på tvers av kode- og ikke-koderegioner av det humane genom. Variantvurdering inkluderer deteksjon av små varianter, kopinummervarianter (CNV-er), homozygositetskjøringer (ROH) og ekspansjoner med kort tandemrepetisjon (STR). I tillegg detekterer TruSight Whole Genome fraværet av SMN1 c.840C-allelet (NM_000344.3:c.840C>T), som kan indikere SMN1-gendelesjon eller SMN1/SMN2-genkonvertering.^{1,2} Biallelisk tap av SMN1 c.840C-allelet er ansvarlig for ca. 95 % av tilfeller av spinal muskelatrofi (SMA).³

[Tabell 2](#) gir informasjon om varianttypene validert med TruSight Whole Genome.

Tabell 1 TruSight Whole Genome Metriske kvalitetsspesifikasjoner

Utdatatype	Metrikk	Spesifikasjon
Kvalitetskontroll av sekvenseringskjøring	Samlet % \geq Q30	\geq 85,0
FASTQ-kvalitetskontroll	Utbytte per prøve (bps)	\geq 90 000 000 000
Kvalitetskontroll av prøvebibliotek	Gjennomsnittlig autosomaldekning	\geq 35,0
	Prosentandel autosomer med dekning større enn 20X	\geq 93,94
	Normalisert dekning ved 60 % til 79 % GC-beholdere	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normalisert dekning ved 20 % til 39 % GC-beholdere	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Gjennomsnittlig mitokondrielldekning	\geq 500,0
	Prosent Q30-baser	\geq 85,0
	Estimert prøvekontaminering	\leq 0,005

Tabell 2 Detekterte varianter validert med TruSight Whole Genome

Varianttype	Validert variantdeteksjon
Små varianter	Enkeltstående nukleotidvarianter (SNV-er), korte insersjoner/delesjoner (1–31 bp)
Kopinummervarianter (CNV-er)	\geq 10 kb gevinster og tap
Homozygositetsskjøringer (ROH)	\geq 500 kb
Mitokondrielle SNV-er	% heteroplasmie hvis \geq 4,75 %
Korte tandemrepetisjoner (STR)	Måltrettede lokuser (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B og TBP)
SMN1-variant	NM_000344.3:c.840C/T

Prosedyreprintsippene

TruSight Whole Genome er beregnet på klargjøring av PCR-frie biblioteker for å produsere sekvenseringsdata fra humant fullgenom. Analysen begynner med å klargjøre biblioteker fra kvantifisert genomisk DNA ekstrahert fra perifert humant fullblod, inkluderer sekvensering og analyse på NovaSeq 6000Dx Instrument ved bruk av TruSight Whole Genome Analysis Application, og slutter med variantbetegnelse og -merknad.

TruSight Whole Genome-analyseprosedyren består av følgende trinn:

- **Batch Planning and Run Creation** (Partiplanlegging og kjøringssopprettning) – Det anbefales på det sterkeste å planlegge partiet og kjøringene før bibliotekklargjøring startes. Opptil 24 prøvebiblioteker kan klargjøres i et bibliotekklargjøringsparti. Basert på antall prøver kan ulike strømningscellekonfigurasjoner brukes (6-pleks på S2 og 16-pleks på S4). Library Tube ID (Biblioteksrør-ID), prøvenavn og tilsvarende indeksering registreres under kjøringssopprettning og kjøringssopprettning. For mer informasjon om kjøringssopprettning, se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931). Følg planlagt parti under utførelsen av arbeidsflyten for bibliotekklargjøring.
- **Preparation for Protocol** (Klargjøring for protokoll) – Noen reagenser er frosne og må nå romtemperatur. På grunn av den korte arbeidsflyten er det mulig å fullføre klargjøring og starte sekvensering på samme dag. Derfor kan forbruksmaterieell for sekvensering for planlagte kjøring også tines under dette trinnet. Kvantifiserte genomiske DNA-prøver tines og fortynnes for optimalisert DNA-innmating.
- **Library Preparation (Bibliotekklargjøring)**
 - **Tagment Genomic DNA** (Tagmentere genomisk DNA) – Bruker Bead-Linked Transposomes PCR-fri (BLT-PF) for å tagmentere DNA-innmatingen. Under tagmentering fragmenteres gDNA, merkes med adaptore og immobiliseres på overflaten av magnetiske BLT-PF kuler.
 - **Post Tagmentation Cleanup** (Rengjøring etter tagmentering) – Rengjør adaptermerket DNA BLT-PF og fjerner stoppbuffer for å klargjøre for Ligere-indekser.
 - **Ligate Indexes** (Ligereindekser) – Legger til unike dobbelindekser i biblioteker for å aktivere multipleksing. Utfører gaputvidelse og eluerer enkeltrådede DNA-biblioteker av kuler.
 - **Size-Selection and Clean Up Libraries** (Størrelsesvalg og biblioteksrengjøring) – En kulerenseprosedyre med dobbeltsidig størrelsesvalg fjerner fragmenter som er for små og for store til å målrette en median fragmentlengde på ca. 450 bp, område ~360 til 550 bp.
 - **Pool and Denature Libraries** (Sammenslåing- og denatureringsbiblioteker) – Selvnormaliseringsfunksjonen til BLT-PF muliggjør sammenslåing etter volum uten qPCR eller annen normalisering. Det spesifiserte volumet for hvert bibliotek slås sammen i henhold til planen for hver kjøring og denatureres med 0.2N NaOH (fortynnet HP3). Den denaturerte gruppen overføres deretter til NovaSeq 6000Dx biblioteksrøret med ID-en som tilsvarer planlagt kjøring.
- **Sequencing and Analysis** (Sekvensering og analyse) – Forbruksmaterieell i S2- og/eller S4-konfigurasjonen lastes inn på NovaSeq 6000Dx Instrument, inkludert tilhørende NovaSeq 6000Dx biblioteksrør med sammenslåtte biblioteker. Ved lasting skannes biblioteksrør-ID og hvis den angis under kjøringssopprettning, brukes den til å velge tilsvarende planlagt kjøring. Ellers må den tilknyttede planlagte kjøringen velges manuelt.

Sammenslåtte biblioteker klynges på en strømningscelle, og sekvenseres deretter ved hjelp av sekvensering ved syntese (SBS)-kjemi på NovaSeq 6000Dx. SBS-kjemi bruker en reversibel terminatorometode for å påvise fluorescensmerkede, enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger.

Programvaren for Real-Time Analysis (RTA) utfører primæranalyse som inkluderer basebetegnelse og tildeling av en kvalitetsscore til hver basebetegnelse. Primæranalysedata overføres automatisk til Illumina DRAGEN serveren.

Demultipleksing og DRAGEN-analyse utføres automatisk med TruSight Whole Genome Analysis Application. Som en del av denne analysen gjennomgås hver kjøring og hvert prøvebibliotek for validitet ved hjelp av analysemetrikk beskrevet i [Kvalitetskontroller på side 32](#), og resultatene leveres i konsoliderte og individuelle prøverapporter. For gyldige prøvebiblioteker genereres annoterte genom-variantbetegnelsesformatfiler (VCF). For mer informasjon om analysearbeidsflyten, se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Prosedyremessige begrensninger

- Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- TruSight Whole Genome er kompatibel med genomisk DNA avledet fra humant perifert fullblod.
- Analysen inkluderer ikke reagenser for DNA-ekstraksjon eller kvantifisering. De analytiske testresultatene, inkludert [Forstyrrende stoffer på side 39](#), er oppnådd med fullblod ved bruk av representative DNA-ekstraksjonssett og DNA-kvantifiseringssett. Alle diagnostiske tester utviklet for bruk med TruSight Whole Genome krever full validering for alle aspekter av ytelse med valgte DNA-ekstraksjonssett.
- Analysen er konfigurert og testet for prøvepleksiteten og indekssettene angitt i følgende tabell.

Partistørrelse for biblioteksklargjøring	Pleksitet	Kjøringskonfigurasjon	Indeksring
6, 12, 18 eller 24 prøver	6-pleks	1–4 S2-kjøringer	S2-sett 1 til 4
16 prøver	16-pleks	1 S4-kjøring	S4-sett 1 eller 2
22 prøver	16-pleks + 6-pleks	1 S4-kjøring + 1 S2-kjøring	S4-sett 1 eller 2, S2-sett 1 til 4 (ikke brukt for S4)

- Analysen håndhever ikke positiv prøvesporing. Selv om oppsummeringsresultatet for ploidykvalitetskontroll som rapporteres av programvaren eventuelt kan brukes til å identifisere prøvebytter, vil det ikke identifisere menn byttet ut med menn eller kvinner byttet ut med kvinner.
- Analysen gir bare validering opp til utdata av genomise VCF-filer. Alle diagnostiske tester som er utviklet for bruk med TruSight Whole Genome krever full validering for alle aspekter av ytelse med valgte nedstrømsprogram.
- Analysen rapporterer ikke variantbetegnelser for prøver som ikke består kvalitetskontrollen.
- Analysen definerer høykonfidensnivåer kun for SNV-er og insersjoner/delesjoner 1–5 bp på grunn av strenge kriterier som brukes for å definere en genomisk kontekst som høykonfidens for en gitt varianttype i [Små varianter konfidensnivåbestemmelse på side 40](#).
- Analysen er utformet for å evaluere CNV-er over hele rapporterbart genom, uavhengig av genomisk kontekst, og ekskluderer regioner med egenskaper som gjenspeiler begrensninger i referansegenomet, slik som sentromer, telomerer og vanlige CNV-er som segregerer i populasjoner.
- Analyseytelsen ble ikke vurdert for kopinumervarianter under 10 kb.
- Analysen rapporterer ikke translokasjoner, inversjoner eller balanserte omorganiseringer.

- Analyseytelsen ble ikke vurdert for insersjoner eller delesjoner av mitokondrielt DNA (mtDNA).
- Analysen rapporterer kun resultater for STR-lokuser oppført i [Tabell 2](#). Når de sanne STR-ekspansjonslengdene overstiger ca. 135 bp, vil den observerte lengden ofte være en undervurdering av den sanne lengden på grunn av tekniske begrensninger av korte avlesninger, der denne effekten er enda mer uttalt for FMR1. Når den sanne STR-lengden overskrider median fragmentlengde (~330 bp), estimerer STR-lengden plataene.
- Analysen rapporterer ikke SMN1- eller SMN2-kopinummer.
- Analysen gjør ikke krav på patogeniteten til detekterte varianter.

Produktkomponenter

TruSight Whole Genome består av følgende:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (katalognr. 20093209) og
- TruSight Whole Genome Analysis Application (katalognr. 20106190, installert av opplært Illumina-personell)

Reagenser

Reagenser som følger med

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Reagensnavn	Antall	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads knyttet til transposomer i bufret vandig løsning.	-25 °C til -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligase, DNA-polymerase, og dNTP-er i bufret vandig løsning.	-25 °C til -15 °C
2 N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N natriumhydroksidoppløsning (NaOH).	-25 °C til -15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder magnesiumsalt, og dimetylformamid.	-25 °C til -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Reagensnavn	Antall	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Bufret vandig løsning som inneholder rengjøringsmiddel og salt.	15 °C til 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Bufret vandig løsning.	15 °C til 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Paramagnetiske kuler, i fast fase, i bufret vandig løsning.	15 °C til 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Rengjøringsmiddelopløsning i vann.	15 °C til 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl-løsning.	15 °C til 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Reagensnavn	Antall	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaringstemperatur
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Unike doble (UD) indeksadaptere arrangert i platen.	-25 °C til -15 °C

Forbruksmaterieell som er påkrevd, men som ikke følger med

- Etanol, 100 % (alkoholinnhold 200), molekylær biologisk kvalitet
- Sertifisert RNase/DNase-free water
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 sykluser) (katalognr. 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 sykluser) (katalognr. 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr. 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr. 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr. 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalognr. 20062291)

Oppbevaring og håndtering

- Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- Hvis noe av emballasjen eller innholdet i TruSight Whole Genome Dx Library Prep komponentene er skadet eller åpnet, må du kontakte Illumina kundeservice.
- Reagensene er stabile når de oppbevares som anvist frem til den angitte utløpsdatoen på settets etiketter. For oppbevaringsforhold, se [Reagenser som følger med på side 5](#). Oppbevar analysekomponentene ved deres spesifiserte temperaturer og ikke bruk utløpte reagenser. Ikke bytt om komponenter fra ulike settpartier. Settpartier kan identifiseres på etikettene på boksene.
- Endringer i reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Reagensene må ikke brukes hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (f.eks. endringer i reagensfarge eller uklarhet). Varm opp til 37 °C i 10 minutter ved tegn til utfelling på ST2, og deretter roterer du til utfellingen løses opp.
- Stabiliteten til TruSight Whole Genome Dx Library Prep er evaluert og ytelsen er demonstrert i opptil fire anvendelser av frosne rør når de fryses mellom bruk.

Utstyr og materiell

Utstyr som er nødvendig, men som ikke følger med

Kontroller kalibreringsstatusen til utstyret før du starter analysen.

Utstyr	Leverandør
Vortekser med kapasitet på 3 000 o/min, flat bunn eller kopp	Generell laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator kalibrert for å sikre temperaturnøyaktighet på ± 2 °C	SciGene, katalognr. 1057-30-O (eller tilsvarende)
Mikroprøveinkubatorinnsats for 96-brønners MIDI-plater	Illumina, katalognr. BD-60-601
Mikrosentrifuge	Generell laboratorieleverandør
96-brønners mikroplatesentrifuge	Generell laboratorieleverandør
Plate med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Kan ristes ved 1800 o/min • Blandingsbane konstant 2 mm • Blandingsnøyaktighet på ± 25 o/min 	VWR, katalognr. 1808-0506 (eller tilsvarende)
Forseglingsskile eller -rull	Generell laboratorieleverandør

Utstyr	Leverandør
Magnetstativ med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Beregnet på utfelling/utskilling av paramagnetiske kuler • Magneter på siden av stativet, ikke bunnen • For 96-brønners MIDI-plater 	Thermo Fisher Scientific, katalognr. AM10027 (eller tilsvarende)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, katalognr. 20068232
Presisjonsdråpetellere (enkanals): <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 20 µl • 200 µl • 1000 µl 	Generell laboratorieleverandør
Presisjonsdråpetellere (8-kanals): <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl • 200 µl 	
Sørg for at dråpetellerne kalibreres regelmessig og er nøyaktige innenfor 5 % av angitt volum	
Hjelpemiddel for dråpeteller	Generell laboratorieleverandør

Materiell som er påkrevd, men som ikke følger med

Sørg for at du har det nødvendige materiellet før du starter protokollen.

Protokollen er optimalisert og validert ved hjelp av artiklene som er oppført. Sammenlignbar ytelse kan ikke garanteres ved bruk av alternative materialer.

Materiell	Leverandør
5 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
10 ml serologiske dråpetellere	Generell laboratorieleverandør
Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner: <ul style="list-style-type: none"> • Avrivbar, optisk klar polyester • Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -40 °C til 110 °C • DNase-/RNase-fri 	Generell laboratorieleverandør
Mikrosentrifugerør, nukleasefrie (1,5, 1,7 eller 2,0 ml, med mindre det er spesifisert som 0,5 ml)	Generell laboratorieleverandør

Materiell	Leverandør
Nukleasefrie reagensbeholdere, 50 ml eller tilsvarende (PVC, engangskar)	Generell laboratorieleverandør
15 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
50 ml kjegleformede rør	Generell laboratorieleverandør
20 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
200 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
1000 µl aerosolresistente dråpetellerspisser	Generell laboratorieleverandør
96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plate)	Thermo Fisher Scientific, delenr. AB-0859 (eller tilsvarende)
96-brønners PCR-plater, 0,2 ml (polypropylen, uten RNase/DNase, lav binding)	Generell laboratorieleverandør
Isbøtte og is	Ikke aktuelt
Kvantifiserte genomiske DNA-prøver	Ikke aktuelt

Prøvetaking, transport og oppbevaring



FORSIKTIG

Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.

- Følg sikkerhetsprosedyrer, inkludert bruk av PVU, ved innsamling, transport, oppbevaring og behandling av humane blodprøver.
- Transport av fullblod skal overholde statlige og lokale bestemmelser for transport av etiologiske agenser.
- Ta 2–5 ml perifert fullblod i EDTA-rør og oppbevar ved 2 °C til 8 °C i opptil fem uker før ekstraksjon.
- Det ble ikke observert påvirkning på analysens ytelse med fullblodsprøver med forhøyet bilirubin, hemoglobin, triglyserid, biotin, eller EDTA til stede. Se Forstyrrende stoffer.
- TruSight Whole Genome er kompatibel med kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett og protokoller egnet for bruk i neste generasjons sekvensering (NGS). Se [Evaluering av DNA-ekstraksjonsmetode på side 38](#).
- TruSight Whole Genome er kompatibel med DNA-eluert i en Tris-bufret løsning inneholdende ≤ 10 mM EDTA, slik som 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Eluering og oppbevaring av DNA i TE anbefales. Unngå oppbevaring i vann for stabilitet.

Anbefalinger for DNA-innmating

- Før TruSight Whole Genome analysen startes, kvantifiseres det genomiske DNA ekstrahert fra fullblod ved hjelp av en fluorometrisk kvantifiseringsmetode som bruker nukleinsyrebindende fargestoffer. Det anbefales at gDNA for prøver beregnet for et bestemt parti for biblioteksklargjøring og sekvenseringskjøring kvantifiseres sammen for å eliminere variasjon fra parti-til-parti når det er mulig, eller prosesskontroller brukes for å sikre $\leq 25\%$ DNA-kvantifisering parti-til-parti-variabilitet.
- Unngå å pipettere små prøvevolumer ($< 2 \mu\text{l}$) for å sikre nøyaktig DNA-kvantifisering og -innmating.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep krever tilstrekkelig DNA til å mette BLT-PF kulene for effektiv selvnormalisering av biblioteksutbytter og optimal ytelse. På grunn av variasjonen i resultater fra forskjellige kvantifiseringsmetoder gir følgende tabell anbefalt DNA-innmating for tre kvantifiseringsmetoder for å sikre optimal analyseytelse. Bruk av andre kvantifiseringsmetoder kan kreve optimalisering. Referer til [DNA-innmatingsfølsomhet på side 38](#).

Kvantitetsmetode	Målt DNA-innmating (ng)	Minimum DNA-stamkonsentrasjon
Quant-iT PicoGreen dsDNA-analysesett	280	11,2 ng/ μl
Qubit dsDNA bredt-område (BR) analysesett	280	11,2 ng/ μl
AccuClear dsDNA-kvantifiseringssett med ultrahøy sensitivitet	350	14 ng/ μl

Ferdighetsanbefalinger

Operatørferdigheter og vellykket analyseimplementering kan vurderes ved å utføre hele arbeidsflyten én gang i henhold til bruksanvisningen. Denne arbeidsflyten kan utføres med enten én enkelt bibliotekklargjøring av 6 prøver og en sekvenseringskjøring ved hjelp av en S2-strømningscelle eller én enkelt bibliotekklargjøring på 16 prøver og en sekvenseringskjøring ved hjelp av en S4-strømningscelle. Suksess indikeres ved å bestå kvalitetskontrollmetrikkene for kjøring og bibliotek registrert i Konsolidert rapport-utdata av TruSight Whole Genome Analysis Application programvaren. Se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Illumina anbefaler å inkludere genomiske DNA-prøver ekstrahert fra perifert fullblod som oppfyller kvalifiseringskriteriene for DNA-stamkonsentrasjon og volum for å demonstrere vellykket analyseintegrasjon med oppstrøms laboratorieprosesser som prøvetaking og lagring, og DNA-ekstraksjons- og kvantifiseringsprosedyrer. Kommersielt tilgjengelige genomiske DNA-referanseprøver avledet fra én enkelt menneskedonor, slik som NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome i et Bottle Consortium) kan også brukes.

Hvis det oppstår problemer, se avsnittet [Feilsøking på side 78](#) for anbefalte tiltak og kontakt Illumina teknisk støtte.

Advarsler og forholdsregler

- **Noen komponenter i denne analysen inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert øyevern, hansker og laboratoriefrakk som er egnet for risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Sikkerhetsdatablader (SDS) finnes på support.illumina.com/sds.html.**
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og aktuelle myndigheter i landet der brukeren og pasienten befinner seg.
- Håndter alle prøver som om de er smittefarlige.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakk ved håndtering av prøver og analysereagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og analysereagensene.
- Denne analysen inneholder polyetylenglykol. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt.
- Denne analysen inneholder natriumhydroksid. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt.
- Bibliotekklargjøringsprosedyrene krever et RNase-/DNase-fritt miljø. Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel.
- Bruk nukleasefrie mikrosentrifugeprøverør, plater, dråpetellerspisser og beholdere.
- Bruk kalibrert utstyr gjennom hele analysen. Kalibrer utstyret i henhold til hastighetene, temperaturene og volumene som er spesifisert i denne protokollen.
- Bruk presisjonsdråpetellere til å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Kalibrer regelmessig i samsvar med produsentens spesifikasjoner.
- Bruk utstyr som er spesifisert for analysen, og still inn programmene i samsvar med instruksjonene.
- Angitte temperaturer for mikroprøveinkubatoren angir angitt reaksjonstemperatur, ikke nødvendigvis utstyrets temperatur.
- Ikke bytt om settkomponenter fra ulike TruSight Whole Genome Dx Library Prep partier. Partier kan identifiseres på etiketten på boksen.
- God laboratoriepraksis er nødvendig for å hindre at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumenter, prøver og biblioteker. Nuklease- og PCR-produkttkontaminasjon kan gi unøyaktige og upålitelige resultater.
- Riktig platetype er nødvendig for optimal analyseytelse og -oppbevaring. Følg plateoverføringsinstruksjonene i [Bruksanvisning på side 15](#).

- Krysskontaminasjon eller prøvetap kan oppstå hvis plateforseglingene ikke påføres eller fjernes forsiktig (referer til [Håndtering av bibliotekklargjøringsplater på side 13](#)).
- Dersom du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i bibliotekskvaliteten.
- Oppbevar analysereagensene eller -komponentene ved angitt temperatur.
- Ikke oppbevar reagenser i en frostfri lagringsenhet.
- Ikke bruk reagenser som har vært oppbevart feil.
- Ikke bruk komponenter utover deres oppgitte utløpsdato.
- Klargjør 0.2N NaOH (fortynnet HP3) ny på bruksdagen og kast gjenværende volum etter bruk.
- Klargjør ny 80 % etanol med RNase/DNase-free water på bruksdagen. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som kan påvirke resultatene. Kast 80 % etanol etter bruk i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser. Bruk etanol av molekylærbiologisk kvalitet.

Prosedyremessige merknader

Tips og teknikker

Unngå krysskontaminasjon

- Når du skal tilsette eller overføre prøver, bytter du spisser mellom *hver prøve*.
- Når du skal tilsette adaptere eller primere med en flerkanals dråpeteller, bytter du spisser mellom *hver brønn*.
- Forsegle og åpne forseglingen av platene forsiktig på en bordplate for å forhindre krysskontaminasjon av prøver.
- For å unngå kontaminering er hver indeksbrønn til engangsbruk.
- Bruk indikerte karvolumer og ikke hell gjenværende volum fra karet tilbake i lagerrør da dette kan forårsake kontaminasjon. Det er tilstrekkelig volum til å støtte arbeidsflyten.
- Ikke slå sammen biblioteker fra ulike klargjøringer.

Nøyaktig pipettering

Bruk følgende retningslinjer ved bruk av flerkanals dråpetellere:

- Kontroller at barrierespissene sitter godt og egner seg til den flerkanals dråpetellerens merke og modell.
- Fest spissene med en rullende bevegelse for å sikre at alle spissene festes like godt.
- Aspirer med like væskevolumer for alle spissene.
- Sakte pipetter viskøse løsninger (BLT-PF, CBELM, TWB2).
- Kontroller etter dispenseringen at det ble dispensert væske fra hver spiss.

Unngå skumming

- Pipetter sakte og vend for å blande. Ikke roter ELM og TWB2.

Håndtering av indeksplater

- Kun gjennombor folieforseglingen for indeksene som skal brukes.
- Hold platen i kantene og unngå å berøre folieforseglingen med noe annet enn rene pipettespisser.
- Ikke gjenbruk brønner som har blitt gjennomboret.
- Kast ubrukt volum (~30 µl) etter bruk fra gjennomborede brønner på indeksplaten, og plasser forseglingen over gjennomborede brønner for å unngå krysskontaminering.
- Ikke plasser forseglingen over ubrukne brønner, da dette forstyrrer gjennom boringen.

Håndtering av bibliotekklargjøringsplater

- Forsegl alltid platen før oppbevaring, risting, inkubering eller sentrifugering.
- Forsegl platen ved å påføre klebedekselet på platen med en forseglingskile eller -rull.
- Kontroller at kantene og brønnene er helt forseglet for å redusere risiko for krysskontaminasjon og fordamping.
- Alltid forsegle plater med en ny klebende plateforsegling. Forseglinger må ikke gjenbrukes.
- Plasser platen på et flatt underlag før du forsiktig fjerner forseglingen.
- Hvis ikke annet er spesifisert, kan trinnene utføres med platen på eller av magneten.

Plateoverføringer

- Overfør det spesifiserte volumet fra hver brønn på en plate til tilsvarende brønn på kildeplaten ved overføring av volumer mellom plater.

Kar

- Reagenskar kan brukes der det er angitt. Bruk følgende retningslinjer:
 - Klargjør karet med CB etter rotering. Det er ikke nødvendig å returnere CB til røret og rotere før det andre kuletilsettingstrinnet.
 - Merk TWB2 og RSB kar for å unngå forvirring.
 - Kast reagenser når angitt eller ved slutten av arbeidsflyten.
- Bruk anbefalt volum. Volumene inkluderer 1 ml dekning for kardødvolum.
- RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Les hver etikett nøye før bruk.

Sentrifugering

- Sentrifuger kun ved angitte trinn i prosedyren for å konsolidere væske eller kuler i bunnen av brønnen for å forhindre prøvetap.

Håndtere kuler

- Skal ikke fryses Cleanup Beads (CB).
- Når du vasker kuler:

- Bruk magnetstativ-96 for alle MIDI-plater.
- Dispenser væske slik at ingen kuler forblir festet på siden av brønnen.
- Hold platen på magnetstativet.
- Tilsett alltid reagenser i midten eller bunnen av brønnen uten å forstyrre kulepelleten. Ikke tilsett reagenser øverst i brønnen.
- Pipetter kulesuspensjoner sakte.
- Roter kulene til de er godt fordelt. Fargen på væsken må se homogen ut. Roter når det er spesifisert i protokollen, for å sikre at kulene suspenderes på nytt på brukstidspunktet.
- Hvis kulene ikke suspenderes på nytt, rist igjen.
- Hvis kuler aspireres inn i dråpetellerspisser når de ikke skal, dispenser reaksjoner tilbake til platen på magnetstativet. Vent til væsken er klar (2 minutter).
- Oppbevares stående for å sikre at kulene er nedsenket i bufferen når de returneres til oppbevaring etter bruk.

Kontroller

TruSight Whole Genome bruker analytiske kontroller innebygd i TruSight Whole Genome Analysis Application programvaren for datakvalifisering og krever ikke bruk av eksterne partikontroller. Se [Kvalitetskontroller på side 32](#) for mer informasjon om metriske spesifikasjoner.

Bruksanvisning

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Arbeidsflyt

Følgende diagram illustrerer TruSight Whole Genome Dx Library Prep-arbeidsflyten. Sikre stoppunkter er merket mellom trinn.

Hvis du stopper, setter du gjenværende reagenser i originalrørene tilbake til oppbevaringstemperaturen angitt i [Reagenser som følger med på side 5](#). Hvis du fortsetter, går du til neste avsnitt i protokollen med de klargjorte reagensene.



Partiplanlegging og oppretting av kjøring

Planlegg antall prøvebiblioteker for partiet, og indeksering og sammenslåing for sekvenseringskjøringer.

TruSight Whole Genome har blitt evaluert og ytelsen demonstrert for fire sett med indekser for S2-strømningscellen ([Figur 1, Tabell 4](#)) og to sett med indekser for S4-strømningscellen ([Figur 2, Tabell 5](#)).

Programvaren håndhever bruk av spesifiserte indekssett. Ikke bland de spesifiserte indekssettene.

Sekvenseringspleksitet utenfor disse anbefalingene støttes ikke.

Settene S2-indeks og S4-indeks støtter sammen partistørrelser for biblioteksklargjøring på 6, 12, 16, 18, 22 og 24 prøver. Bruk de kompatible indekssettene oppført i [Tabell 3](#) for hver partistørrelse for biblioteksklargjøring.

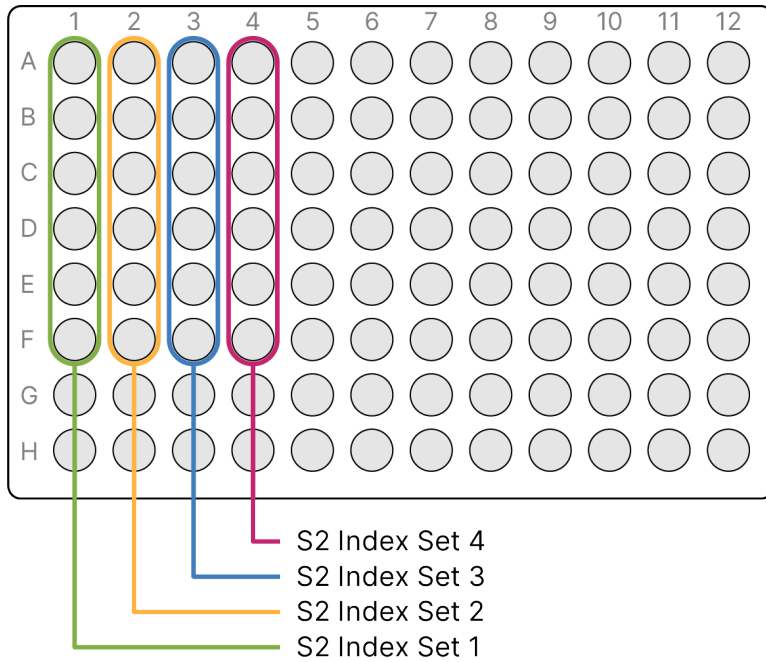
**FORSIKTIG**

Ordne prøver i platen ved hjelp av en orientering som samsvarer med planlagte indeksering, dvs. rad A til H for et 16-pleks, eller rad A til F for et 6-pleks. Legg til indekser ved hjelp av en flerkanals dråpeteller for å unngå å hoppe over en brønn eller legge til to indekssett i én enkelt prøve, noe som kan føre til henholdsvis ingen resultater eller falske resultater.

Tabell 3 Indekssettalternativer for biblioteksklargjøringsparti

Partistørrelse for biblioteksklargjøring	Indekssett	Strømningscellekonfigurasjoner
6 prøver	S2-indekssett 1, 2, 3 eller 4 (velg et hvilket som helst sett)	S2 x 1
12 prøver	S2-indekssett 1, 2, 3 eller 4 (velg hvilke som helst to sett)	S2 x 2
18 prøver	S2-indekssett 1, 2, 3 eller 4 (velg hvilke som helst tre sett)	S2 x 3
24 prøver	S2-indekssett 1, 2, 3 og 4	S2 x 4
16 prøver	S4-indekssett 1 eller 2	S4 x 1
22 prøver	S4-indekssett 1 + S2-indekssett 3 eller 4 S4-indekssett 2 + S2-indekssett 1 eller 2	S4 x 1 og S2 x 1

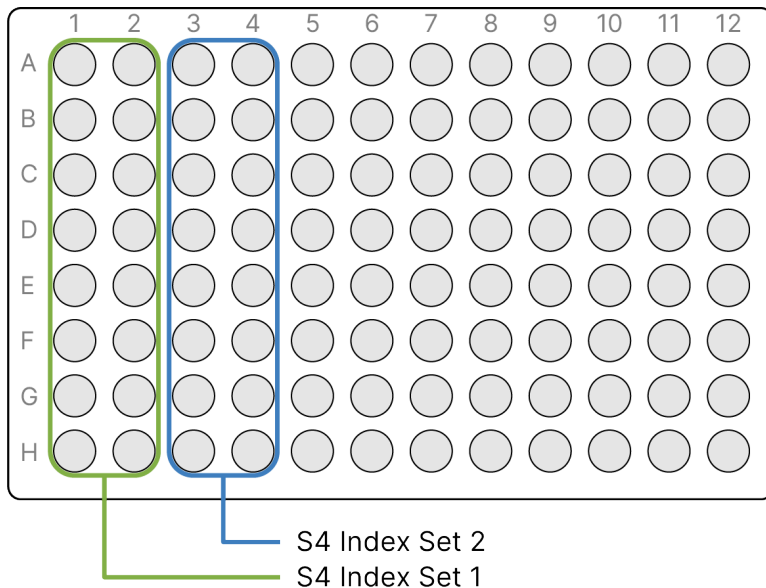
Figur 1 Indeksplateoppsett som viser fire indekssett for sekvensering av S2-strømningscelle



Tabell 4 S2-indekssett for S2-strømningscelle

	S2-indekssett 1 (grønt)	S2-indekssett 2 (gult)	S2 indekssett 3 (blått)	S2-indekssett 4 (magenta)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Figur 2 Indeksplateoppsett som viser to indekssett for sekvensering av S4-strømningscelle



Tabell 5 S4-indekssett for S4-strømningscelle

	S4-indekssett 1 (grønt)		S4-indekssett 2 (blått)	
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
G	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
H	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Registrer unikt partinavn og prøvedata, inkludert prøve-ID, tilknyttet indeksplatebrønn-ID (referer til [Vedlegg A på side 93](#)), biblioteksplate, biblioteksplatebrønn-ID og biblioteksør-ID (hvis kjent). Denne informasjonen angis under oppretting av kjøring.

Forinstruksjoner om hvordan du bruker programmet til å Create Runs (Opprette kjøring), referer til Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931). Registrer Run Name (Kjøringsnavnet) som skal brukes under lasting av forbruksmaterieill.

⚠ FORSIKTIG

Kontroller at indeksene og de tilknyttede prøvene som brukes under biblioteksklargjøring, samsvarer med de registrert og brukt til Create Run (Opprette kjøring). Avvik kan føre til rapportering av feilaktige resultater eller ingen resultater.

Klargjør for protokoll

Klargjør reagenser og utstyr

Hvis du planlegger å sekvensere samme dag, må du tine forbruksmaterieell for sekvensering på forhånd. Se NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105) for detaljerte instruksjoner.

1. Forvarm mikroprøveinkubator med MIDI-plateinnsats til 47 °C.
2. Ta følgende reagenser ut av esken og tin på følgende måte.

Tabell 6 Oppbevares ved -25 °C til -15 °C

Reagens	Navn på eske	Instruksjon for tining
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	La tine ved romtemperatur i 30 minutter. Holdes så på is til den trengs.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.
UD-indekser	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.

Tabell 7 Oppbevares ved 15 °C til 30 °C

Reagens	Navn på eske	Instruksjon for tining
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Brukes ved romtemperatur.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Brukes ved romtemperatur.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Brukes ved romtemperatur.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Brukes ved romtemperatur.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Brukes ved romtemperatur.

**FORSIKTIG**

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert øyevern, hansker og laboratoriefrakk som er egnet for risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

Klargjøre DNA-prøver

Klargjør følgende forbruksmateriell.

- Kvantifiserte gDNA-prøver:
 - a. La nå romtemperatur.
 - b. Sentrifuger et kort øyeblikk for å samle opp dråper.
 - c. Pulsroter eller pipettere for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- RSB – Roter eller vend for å blande. Holdes ved romtemperatur.
 - RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Les hver etikett nøye før bruk.

Prosedyre

Avhengig av DNA-innmatingen, som varierer basert på hvilken DNA-kvantifiseringsmetode som brukes, beregner du volumene som kreves for å klargjøre fortynnede DNA-prøver. Formler er gitt nedenfor for de tre DNA-kvantifiseringsmetodene som ble testet. Se [Anbefalinger for DNA-innmating på side 10](#) og [Vedlegg B på side 96](#) for mer informasjon.

Beregninger forutsetter et minimum pipetteringsvolum på 2,0 µl og inkluderer 10 % dekning. Avrunding skal utføres i de siste trinnene, etter fullført beregning, med det nødvendige antallet desimaler for å sikre nøyaktig pipettering.

Alternativ 1: 280 ng DNA-innmating for kvantifiseringsmetoder med bredt område og Qubit-kvantifiseringsmetoder

Minimum DNA-stamkonsentrasjon i prøven er 11,2 ng/µl. Det er mer sannsynlig at prøver < 11,2 ng/µl ikke består kvalitetskontroll for bibliotek etter sekvensering. Avhengig av konsentrasjonen av DNA-stammen, bruk en av ligningene nedenfor for å utføre beregninger.

1. For DNA-stamkonsentrasjon 11,2 til 154,0 ng/µl, beregner du volumet av DNA-stammateriale og nødvendig RSB ved bruk av samlet volum av fortynnet DNA på 27,5 µl (25 µl pluss 10 % dekning) som konstant:
 - a. Beregn volumet av DNA-stam:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA – stamvolum } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Input DNA target (ng)} + 10 \% \text{ dekning})}{\text{DNA–stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l})} \\
 &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{DNA – stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l}) \\
 &= 308 \text{ ng} / \text{DNA – stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- b. Beregn volumet av RSB-stam:

$$\begin{aligned}
 \text{RSB – volum } (\mu\text{l}) &= \text{samlet volum av fortynnet DNA } (\mu\text{l}) - \text{beregnet DNA – stamvolum } (\mu\text{l}) \\
 &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{beregnet DNA – stamvolum } (\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- c. Verifiser beregninger: Bekreft beregnet DNA-stamvolum (μl) + beregnet volum på RSB (μl) = 27,5 μl , samlet volum av fortynnet DNA (en konstant, 25 μl pluss 10 % dekning).

2. Alternativt, for DNA-stamkonsentrasjoner > 154,0 ng/ μl , beregner du samlet volum av fortynnet DNA og nødvendig RSB ved bruk av DNA-stamvolum 2,0 μl og målfortynnet DNA-stamkonsentrasjon 11,2 ng/ μl som konstanter.

- a. Beregn samlet volum av fortynnet DNA:

$$\begin{aligned}
 \text{Samlet volum fortynnet DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{DNA–stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l}) \times \text{volum av DNA–stammateriale } (\mu\text{l})}{\text{Målfortynnet DNA–stamkonsentrasjon}} \\
 &= \text{DNA – stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

- b. Beregn volumet av RSB:

$$\begin{aligned}
 \text{RSB – volum } (\mu\text{l}) &= \text{Beregnet samlet volum av fortynnet DNA } (\mu\text{l}) - \text{DNA – stamvolum } (\mu\text{l}) \\
 &= \text{Beregnet samlet volum av fortynnet DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

- c. Verifiser beregninger: Bekreft beregnet samlet volum fortynnet DNA (μl) – beregnet volum på RSB (μl) = 2,0 μl , DNA-stamvolumet (konstant).

Fortsett til trinn 3 nedenfor.

Alternativ 2: 350 ng DNA-innmating for Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method (Accuclear ultrahøy sensitivitetskvantifiseringsmetode)

Minste DNA-stamkonsentrasjon i prøven er 14,0 ng/ μl . Det er mer sannsynlig at prøver < 14,0 ng/ μl ikke består bibliotek kvalitetskontroll etter sekvensering. Avhengig av konsentrasjonen av DNA-stammen, bruk en av ligningene nedenfor for å utføre beregninger.

1. For DNA-stamkonsentrasjon 14,0 til 192,5 ng/ μl , beregn volumet av DNA-stammateriale og nødvendig RSB ved bruk av samlet volum fortynnet DNA på 27,5 μl (25 μl pluss 10 % dekning) som konstant:

- a. Beregn volumet av DNA-stam:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA – stamvolum } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Input DNA target (ng)} + 10 \% \text{ dekning})}{\text{DNA–stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l})} \\
 &= 350 \text{ ng} \times 1.1 / \text{DNA – stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l}) \\
 &= 385 \text{ ng} / \text{DNA – stamkonsentrasjon (ng}/\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- b. Beregn volumet av RSB-stam:

$$RSB - \text{volum } (\mu\text{l}) = \text{samlet volum av fortynnet DNA } (\mu\text{l}) - \text{beregnet DNA} - \text{stamvolum } (\mu\text{l}) \\ = 27,5 (\mu\text{l}) - \text{beregnet DNA} - \text{stamvolum } (\mu\text{l})$$

- c. Verifiser beregninger: Bekreft beregnet DNA-stamvolum (μl) + beregnet volum på RSB (μl) = 27,5 μl , samlet volum av fortynnet DNA (en konstant, 25 μl pluss 10 % dekning).
2. For DNA-stamkonsentrasjoner > 192,5 ng/ μl kan du alternativt beregne samlet volum av fortynnet DNA og nødvendig RSB ved å bruke DNA-stamvolumet 2,0 μl som konstant.
 - a. Beregn samlet volum av fortynnet DNA:

$$\text{Samlet volum fortynnet DNA } (\mu\text{l}) = \frac{\text{DNA-stamkonsentrasjon (ng/\mu l)} \times 2,0 \mu\text{l}}{14,0 \text{ ng/\mu l}}$$
 - b. Beregn volumet av RSB:

$$RSB - \text{volum } (\mu\text{l}) = \text{samlet volum av fortynnet DNA } (\mu\text{l}) - \text{DNA} - \text{stamvolum } (\mu\text{l}) \\ = \text{totalt volum } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l}$$
 - c. Verifiser beregninger: Bekreft beregnet samlet volum fortynnet DNA (μl) – beregnet volum på RSB (μl) = 2,0 μl , DNA-stamvolumet (konstant).
3. Merk et nytt 0,5 ml mikrosentrifugerør for hver fortynnet prøve.
4. Tilsett volum av RSB beregnet ovenfor i respektivt rør for hver fortynnet prøve.
5. Tilsett volum av DNA-stam beregnet ovenfor i det respektive røret for hver fortynnet prøve.
6. Pulsroter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Bibliotekklargjøring

Bruk klargjøringstrinnene i dette avsnittet til å klargjøre reagenser på forhånd.

Hvis ikke et sikkert stoppunkt er angitt, går du straks videre til neste trinn.

Klargjøring

Klargjør følgende forbruksmaterieell:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Roter for å blande. Hvis du bruker flere rør, roterer du for å blande og deretter kombinere.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Roter for å blande.
 - b. Sentrifuger et kort øyeblikk.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Inspiser for utfelling. Varm opp til 37 °C i 10 minutter ved tegn til utfelling, og deretter roterer du til utfellingene løses opp.
 - b. Roter grundig, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- ELM (Extension Ligation Mix):

- a. Bland ved å vende. Ikke roter.
- b. Oppbevares på is til det skal brukes.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - b. Holdes ved romtemperatur.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - b. Holdes ved romtemperatur.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Roter i 1 minutt.
 - b. Vend 2–5 ganger, og roter deretter grundig for å resuspendere.
- Indeksadaptere (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - b. Holdes ved romtemperatur.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Merk røret TWB2.
 - b. Vend grundig for å blande.
- I et mikrosentrifugerør merket 0.2N NaOH, kombinerer du følgende volumer for å klargjøre i 0.2N NaOH henhold til planlagt partistørrelse. Roter for å blande.

MERK Hvis du planlegger å slå sammen og denaturere biblioteker samme dag, klargjør du ytterligere 0.2N NaOH. Se [Klargjøring på side 29](#).

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1080

- I et 15 ml kjegleformet rør kombineres følgende volumer for å klargjøre 80 % EtOH i henhold til planlagt partistørrelse. Overskudd for bruk av kar er inkludert. Roter for å blande.

Reagens	6 prøver (ml)	12 prøver (ml)	16 prøver (ml)	18 prøver (ml)	22 prøver (ml)	24 prøver (ml)
100 % etanol, ren (200 prøvetrykk)	4	8	8	12	12	12

Reagens	6 prøver (ml)	12 prøver (ml)	16 prøver (ml)	18 prøver (ml)	22 prøver (ml)	24 prøver (ml)
Nukleasefritt vann	1	2	2	3	3	3

**FORSIKTIG**

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert øyevern, hansker og laboratoriefrakk som er egnet for risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

Tagmentere genomisk DNA

Dette trinnet bruker Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) for å tagmentere DNA, som er en prosess som fragmenterer og merker DNA-et med adaptersekvenser.

Forbruksmaterieill

- 96-brønners MIDI-plate
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

Prosedyre

1. Kontroller at mikroprøveinkubatoren med MIDI-plateinnsats er forvarmet til 47 °C.
2. Merk en ny 96-brønners MIDI-plate med LP1 (Library Plate 1).
3. Angi og registrer prøvebrønn-ID-er for tagmentering av fortynnede DNA-prøver og reagenser.
4. Overfør 25 µl fortynnet prøve-DNA til hver brønn.
5. Tilsett 10 µl TB1 i hver brønn.
6. Roter BLT-PF kraftig i 1 minutt for å resuspendere. Ikke sentrifuger. Gjenta etter behov.
7. Tilsett 15 µl BLT-PF i hver brønn.
8. Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt.
9. Inkuber LP1 i forvarmet mikroprøveinkubator ved 47 °C i 8 minutter.

MERK Det forventes lett kondens på plateforseglingen. Ikke sentrifuger.

- Fjern forseglingen og tilsett 10 µl ST2 i hver brønn.
- Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt, og fortsett deretter til neste trinn.

Rengjøring etter tagmentering

Følgende trinn vasker bort ubundet DNA og utfører bufferbytte for å klargjøre for neste trinn.

Forbruksmaterieill

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Kar

Om reagenser

- Pipetter TWB2 sakte for å minimere skumdannelse.
- RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Les hver etikett nøye før bruk.

Prosedyre

- Fjern forseglingen og sett LP1 på magnetstativet og vent til væsken er klar (2 minutter).
- Klargjør TWB2-karet med volumer i henhold til følgende tabell, og merk karet tydelig med TWB2. Volumene inkluderer 1 ml dekning for kardødvolum. Behold karet for senere trinn.

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

- MP1 på magnetstativet, bruk en multikanals dråpeteller satt til 60 µl til å fjerne og kaste supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
- Bruk en flerkanals dråpeteller og tilsett 150 µl TWB2 i hver brønn.
- Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt.
- Fjern forseglingen og sett LP1 på magnetstativet og vent til væsken er klar (2 minutter).
- Returner BLT-PF til frossen lagring under inkubering, og fortsett deretter til neste trinn.

Ligere indekser

I dette avsnittet ligerer brukere de unike dobbeltindeksadapterne til hver prøve i henhold til indeksering planlagt under [Partiplanlegging og oppretting av kjøring på side 15](#).

Forbruksmaterieill

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Indeksadaptere (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) kar

- 0.2N NaOH (Fortynnet HP3)

Om reagenser

- Indeksplatebrønnene kan ikke gjenbrukes.
- Aspirer og dispenser ELM sakte med tanke på oppløsningens viskositet.
- RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Les hver etikett nøye før bruk.

Prosedyre

1. Hold LP1 på magnetstativet og fullfør følgende trinn:
 - a. Bruk en flerkanals dråpeteller satt til 150 µl for å fjerne og kaste supernatant fra hver brønn.
 - b. Uten å forstyrre kulepelleten, bruk en 20 µl-dråpeteller for å fjerne og kaste TWB2-rester fra hver brønn.
 - c. Tilsett 45 µl ELM i hver brønn.
 - d. Stikk hull i folieforseglingen på indeksadapterplaten for hver av de planlagte indeksbrønnene ved hjelp av en P200 flerkanals dråpeteller og nye dråpetellerspisser. Bruk en ny dråpetellerspiss for hver brønn for å unngå kontaminasjon.
 - e. Tilsett 5 µl indeksadaptere i de tilsvarende prøvebrønnene i LP1 i henhold til indeksene valgt under partiplanleggingen ved hjelp av en P-10 eller P-20 flerkanals dråpeteller.
2. Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt.
3. Inkuber LP1 i forvarmet mikroprøveinkubator ved 47 °C i 8 minutter.

MERK Det forventes lett kondens på plateforseglingen. Ikke sentrifuger.

4. Returner ELM til frossen oppbevaring under inkubering.
5. Fjern forseglingen og sett LP1 på magnetstativet og vent til væsken er klar (2 minutter).
6. Med LP1 på magnetstativet, bruk en multikanals dråpeteller satt til 50 µl til å fjerne og kaste supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
7. Vask kuler på følgende måte:
 - a. Tilsett 150 µl TWB2 på kulene i hver brønn ved hjelp av en flerkanals dråpeteller.
 - b. Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt.
 - c. Fjern forseglingen og sett LP1 på magnetstativet og vent til væsken er klar (2 minutter).
 - d. Med LP1 på magnetstativet, bruk en flerkanals dråpeteller satt til 150 µl til å fjerne og kaste supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
8. Vask kulene en **andre** gang.
9. Med LP1 på magnetstativet bruker du en flerkanals dråpeteller satt til 20 µl til å fjerne og kaste rester TWB2 fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
10. Tilsett 45 µl med tidligere klargjort 0.2N NaOH i hver brønn.
11. Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt, og fortsett deretter til neste avsnitt.

Størrelsesvalg og biblioteksrengjøring

Dette trinnet bruker et dobbeltsidig størrelsesvalg av biblioteker. I det første trinnet legges Cleanup Beads til de eluerte bibliotekene og BLT-PF kulene. Deretter overføres supernatant som inneholder eluert enkeltstrenget bibliotek til en ny plate mens fragmenter som er for store ligger igjen. I det andre trinnet legges Cleanup Beads til de overførte bibliotekene og fragmenter som er for små fjernes. Deretter elueres bibliotekene og overføres til den endelige bibliotekplaten (FLP).

Forbruksmaterieill

- 96-brønners MIDI-plate
- Kar (3)
- PCR-plate
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nylig klargjort 80 % etanol (80% EtOH)

Klargjøring

1. Først roterer CB, og så vender du til den er fullstendig resuspendert.
2. Klargjør CB-karet med volumer i henhold til følgende tabell og merk karet CB. Volumene er tilstrekkelige for begge tilleggstrinnene og inkluderer 1 ml overskudd i karet for karetets dødsvolum. Det er ikke nødvendig å blande mellom CB tilleggstrinn. Kulene vil forbli spredt så lenge prosedyren varer.

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

Prosedyre

1. Fjern forseglingen og tilsett 40 µl CB i brønnene på LP1 MIDI-platen som inneholder BLT-PF og 0.2N NaOH.
2. Forsegl og rist LP1 ved 1800 o/min i 1 minutt.
3. Inkuber LP1 av magnetstativet i romtemperatur i 2 minutter.
4. Forsegl og rist LP1 på magnetstativet og vent til væsken er klar (5 minutter).
5. Mens platen inkuberes, merker du en ny 96-brønners MIDI-plate med LP2.
6. *Overfør* 80 µl supernatant fra LP1 mens den er på magnetstativet til tilsvarende brønner med LP2 ved hjelp av en flerkanals dråpeteller.
7. Tilsett 40 µl CB i hver brønn i LP2 MIDI-platen.
8. Forsegl og rist LP2 ved 1800 o/min i 1 minutt.
9. Kast LP2 MIDI-platen.

10. Inkuber LP2 av magnetstativet i romtemperatur i 2 minutter.
11. Fjern forsegling og sett LP2 på magnetstativet og vent til væsken er klar (5 minutter).
12. Med LP2 på magnetstativet, bruk et flerkanals dråpeteller satt til 120 µl til å fjerne og kaste all supernatant fra hver bibliotekbrønn uten å forstyrre kulepelleten.
13. Hell tidligere klargjort 80 % EtOH i et merket kar og vask kulene med LP2 på magneten på følgende måte.
 - a. Tilsett 180 µl 80 % EtOH med en flerkanals dråpeteller.
 - b. Vent i 30 sekunder.
 - c. Bruk en flerkanals dråpeteller satt til 180 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.
14. Vask kulene en **andre** gang.
15. Med LP2 på magnetstativet bruker du en flerkanals dråpeteller satt til 20 µl til å fjerne og kaste gjenværende EtOH fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
16. La LP2 lufttørke på magnetstativet i 4 minutter.
17. Kast ubrukt 80 % EtOH og karet.
18. Klargjør RSB-karet med volumer i henhold til følgende tabell og merk karet med RSB. Volumene inkluderer 1 ml dekning for kardødvolum.

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. Tilsett 65 µl RSB på kulene i hver brønn.
20. Forsegl og rist LP2 ved 1800 o/min i 1 minutt.
21. Inkuber LP2 i romtemperatur i 2 minutter.
22. Fjern forseglingen og sett LP2 på magnetstativet og vent til væsken er klar (2 minutter).
23. Merk en ny PCR-plate med FLP (endelig biblioteksplate) og med partinavnet brukt ved oppretting av kjøringen.
24. *Overfør* 60 µl supernatant fra LP2 mens det er på magnetstativet, til tilsvarende FLP-brønner ved hjelp av en flerkanals dråpeteller.

**FORSIKTIG**

Supernatanten inneholder endelig bibliotek og vil bli brukt under sammenslåings- og denatureringstrinnet. Skal ikke kastes.

25. Kast alle kar sammen med ubrukte reagenser i kar.
26. Kast LP2 MIDI-platen.

SIKKERT STOPPUNKT

Ved stopping, forsegle den endelige bibliotekplaten (FLP) med Microseal B og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 14 dager.

Poole og denaturere biblioteker

I denne delen oppretter brukere sammenslåinger som er planlagt i [Partiplanlegging og oppretting av kjøring på side 15](#) og fortynner og denaturerer.

Forbruksmateriell

- HP3 (2N NaOH), eller 0.2N NaOH hvis klargjort på samme dag – Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- NB (Neutralization Buffer) – Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- RSB (Resuspension Buffer) – Roter eller vend for å blande.
- Mikrosentrifugerør (1 for reagensklargjøring og 1 for hver planlagte biblioteksammenslåing)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 eller PN 20062291) (1 rør for hver planlagte bibliotekssammenslåing)

Klargjøring

1. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre 0.2N NaOH. Merk røret med 0.2N NaOH. Hvis ytterligere 0.2N NaOH ble klargjort under bibliotekklargjøring og protokoll utføres samme dag, hopp over dette trinnet.

For å unngå små pipetteringsfeil klargjøres ekstra volum.

Reagens	Volum for hver S2-strømningscelle (µl)	Volum for hver S4-strømningscelle (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Prosedyre

1. Hvis FLP-platen ble oppbevart frosset, klargjør som følger. Ellers går du til trinn [2](#).
FLP-plate:
 - a. La tine ved romtemperatur i 30 minutter.
 - b. Sentrifuger ved 1000 × g i 1 minutt.
 - c. Fjern forseglingen fra FLP.
 - d. Pipetter blandingen 5 til 10 ganger ved bruk av en flerkanals dråpeteller satt til 30 µl.

- e. Forsegle og sentrifuger ved $1000 \times g$ i 1 minutt.
2. Velg ett av følgende alternativer for å slå sammen, denaturere og fortynne bibliotekene for hvert sett med 6 eller 16 prøver planlagt for sekvensering.

Alternativ 1 Sekvenser 6 biblioteker på S2-strømningscelle.

- a. For hver biblioteksammenslåing merker du et nytt mikrosentrifugerør med sammenslåingsnavnet, for eksempel sammenslåtte biblioteker (PL) 1, 2, 3 osv.
- b. Fjern forseglingen og overfør 25 μl av hvert DNA-bibliotek strekkodet fra et gitt S2-indekssett fra FLP-platen til PL-røret for hver korresponderende planlagte kjøring i henhold til sekvenseringssammenslåingene planlagt under [Partiplanlegging og oppretting av kjøring på side 15](#). Kombiner for eksempel biblioteker som er klargjort med S2-indekssett 1, i PL-røret.
- c. Påfør klebende plateforsegling på FLP-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
- d. Tilsett 37 μl 0.2N NaOH i hvert PL-rør.
- e. Roter hvert PL-rør for å blande. Sentrifuger et kort øyeblikk.
- f. Inkuber hvert PL-rør ved romtemperatur i 8 minutter.
- g. Tilsett 38 μl NB i hvert PL-rør.
- h. Roter hvert PL-rør for å blande. Sentrifuger et kort øyeblikk.
- i. Overfør 225 μl denaturert, fortynnet bibliotek til et rent NovaSeq 6000Dx biblioteksør.

**FORSIKTIG**

Hvis tidligere spesifisert, vil NovaSeq 6000Dx biblioteksør-ID-en brukes til å identifisere og tilknytte planlagt kjøring. Kontroller at biblioteksør-ID-en som sammenslåingen overføres til, er samme biblioteksør-ID spesifisert i Create Run (Opprett kjøring), ellers kan det oppstå feil tilknytning av prøveresultater. Hvis biblioteksør-ID er spesifisert i planlagt kjøring, bekreft at riktig rør brukes. Hvis det ikke er spesifisert tidligere, registrerer du biblioteksør-ID-en som brukes og reviderer planlagt kjøring, ellers må tilknyttet planlagt kjøring velges manuelt ved lasting av instrumentet ved hjelp av kjøringensnavnet.

Alternativ 2 Sekvenser 16 biblioteker på S4-strømningscelle.

- a. Merk et nytt mikrosentrifugerør med sammenslåingsnavnet, for eksempel sammenslåtte biblioteker (PL) 1, 2, 3, osv.
- b. Fjern forseglingen og overfør 18 μl av hvert DNA-bibliotek fra FLP-platen til PL-røret i henhold til planlagt sekvenseringssammenslåing under [Partiplanlegging og oppretting av kjøring på side 15](#). Kombiner for eksempel biblioteker med bruk av S4-indekssett 1 i PL-røret.
- c. Påfør klebende plateforsegling på FLP-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
- d. Tilsett 22 μl RSB i PL-røret.
- e. Tilsett 77 μl 0.2N NaOH i PL-røret.
- f. Bland ved å rotere PL-røret. Sentrifuger et kort øyeblikk.
- g. Inkuber PL-røret ved romtemperatur i 8 minutter.
- h. Tilsett 78 μl NB buffer i PL-røret.

- i. Bland ved å rotere PL-røret. Sentrifuger et kort øyeblikk.
- j. Overfør 465 µl denaturert, fortynnet bibliotek til et rent NovaSeq 6000Dx biblioteksør.



FORSIKTIG

Hvis tidligere spesifisert, vil NovaSeq 6000Dx biblioteksør-ID-en brukes til å identifisere og tilknytte planlagt kjøring. Kontroller at biblioteksør-ID-en som sammenslåingen overføres til, er samme biblioteksør-ID spesifisert i Create Run (Opprett kjøring), ellers kan det oppstå feil tilknytning av prøveresultater. Hvis biblioteksør-ID er spesifisert i planlagt kjøring, bekreft at riktig rør brukes. Hvis det ikke er spesifisert tidligere, registrerer du biblioteksør-ID-en som brukes og reviderer planlagt kjøring, ellers må tilknyttet planlagt kjøring velges manuelt ved lasting av instrumentet ved hjelp av kjøringens navn.

3. Fortsett rett til sekvensering hvis du planlegger å starte kjøringen samme dag.

SIKKERT STOPPUNKT

Ved stopping, sett hette på NovaSeq 6000Dx biblioteksørret og oppbevarer det ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Klargjøre til sekvensering

1. Følg klargjøringsinstruksjonene i NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105) for forbruksmateriell i settet planlagt for sekvensering.
2. Hvis NovaSeq 6000Dx biblioteksørret som inneholder sammenslått bibliotek ble lagret frosset, klargjør på følgende måte. Hvis du fortsetter direkte fra forrige avsnitt, gå til [3](#).
 - a. La tine ved romtemperatur i 30 minutter.
 - b. Fjern hetten og pipetter forsiktig blandingen fem ganger ved bruk av en P1000-dråpeteller satt til 300 µl for S4-strømningscellebibliotekspoolingen eller en P200-dråpeteller satt til 145 µl for S2-strømningscellebibliotekspoolingen.
 - c. Sett hetten på NovaSeq 6000Dx biblioteksørret og rist eventuelle dråper til bunnen for hånd. Ikke roter eller sentrifuger.
3. Laste inn forbruksmateriell. Referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105) for detaljer.

Tolking av resultater

TruSight Whole Genome er utformet for å sekvensere hele det menneskelige genomet. Varianter rapporteres for prøver som består analytiske kvalitetskontroller (QC) for bruk med nedstrøms tertæranalyse for kimbaneprogrammer.

- Et resultat for sekvensering, FASTQ eller prøve kvalitet anses som gyldig bare hvis kvalitetsmetrikken oppfyller eller overskrider definert spesifisering. Hvis kvalitetsmetrikken er under definert spesifisering, rapporteres ytelsen som MISLYKKET, og prøven må gjentas. For informasjon om kvalitetsmetriske spesifiseringer som brukes til å bestemme prøvevaliditeten, referer til [Kvalitetskontroller på side 32](#).
- Prøver som består alle kvalitetstærskler, forventes å gi variantbetegnelsesytelse som beskrevet i nøyaktighetsstudien (referer til [Nøyaktighet på side 44](#)).
- Små varianter er merket med høy, intermediær eller lav konfidens basert på hver varianttypes forventede ytelse (se [Små varianters konfidensnivåbestemmelse på side 40](#)).
- Tolkning av all variantinformasjon må valideres av laboratoriet ved hjelp av medfølgende analyseutdatafiler. Se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931) for en beskrivelse av informasjonen i utdatafilene.

Kvalitetskontroller

Sekvenseringskjøring og prøvevaliditet bestemmes automatisk ved hjelp av analytiske kontroller og rapporteres av TruSight Whole Genome Analysis Application (se [Tabell 8](#) for ytterligere detaljer om metriske spesifiseringer for kvalitetskontroll). TruSight Whole Genome krever ikke bruk av eksterne positive kontroller.

- Kvalitetskontrollresultatene rapporteres i en konsolidert rapport, for alle prøver i en kjøring og i kvalitetskontrollrapporter for individuelle prøver. Rapportene utmates av programvaren til analysemappen. Se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931) for plassering av analysemappen og kjøringssmappen.
- Feil i kvalitetskontrollspesifiseringen for sekvenseringskjøringen ugyldiggjør sekvenseringskjøringen og stopper ytterligere analyse.
- Feil på noen prøve-FASTQ eller bibliotekspesifisering ugyldiggjør prøvebiblioteket og forhindrer utdata fra tilknyttede CRAM- eller VCF-filer.
- Ytterligere kvalitetskontrolltiltak kan gjelde i samsvar med lokale, regionale og/eller nasjonale bestemmelser eller akkrediteringskrav.

Mer informasjon om å gjenta sekvenseringskjøringer eller biblioteksklargjøring finnes under [Feilsøking på side 78](#).

Tabell 8 TruSight Whole Genome Beskrivelser av metrikkspesifikasjon for kvalitetskontroll

	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse
Kvalitetskontroll av sekvenseringskjøring	Samlet % \geq Q30	\geq 85	Mål på basekvalitet på kjøringnivå. Minimumsspesifikasjon er angitt fordi for lave %Q30-kjøringer ikke vil bestå Q30-baser i prøvebibliotek-kvalitetskontroll.
FASTQ-kvalitetskontroll	Utbytte per prøve (bps)	\geq 90 000 000 000	Minimum er angitt til å tilsvare ~26x gjennomsnittlig autosomaldekning for triage-prøver som ikke vil bestå kvalitetskontroll av bibliotek for å redusere analysesiden.

	Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse
Kvalitetskontroll av prøvebibliotek	Gjennomsnittlig autosomaldekning	≥ 35	Gjennomsnittlig dekning på tvers av autosomer. Minimumsspesifikasjon er angitt for å sikre analytisk ytelse.

Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse
Prosentandel autosomer med dekning større enn 20X	≥ 93,94	Mål på dekningsuniformitet som detekterer problemer ikke nødvendigvis knyttet til GC-partiskhet. Minimumsspesifikasjon er angitt for å sikre analytisk ytelse.

Metrikk	Spesifikasjon	Beskrivelse
Normalisert dekning ved 60 % til 79 % GC-beholdere	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Mål på dekningsuniformitet som detekterer GC-bias, spesifikt tap av dekning i områder av genomet med høyere %GC og lavere %AT-basesammensetning. Minimums- og maksimumsspesifikasjoner er angitt for å sikre analytisk ytelse.
Normalisert dekning ved 20 % til 39 % GC-beholdere	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Mål på dekningsuniformitet som detekterer GC-bias, spesifikt tap av dekning i områder av genomet med lavere %GC og høyere %AT-basesammensetning. Minimums- og maksimumsspesifikasjoner er angitt for å sikre analytisk ytelse.
Gjennomsnittlig mitokondrielldekning	≥ 500	Dekning av mitokondrielt kromosom. Minimumsspesifikasjon er angitt for å sikre mitokondriell SNV-deteksjonsgrense.
Prosent Q30-baser	≥ 85	Mål på basiskvalitet. Minimumsspesifikasjon er angitt for å sikre analytisk ytelse.
Estimert prøvekontaminering	$\leq 0,005$	Registrerer kontaminerende avlesninger fra andre prøver. Maksimal spesifikasjon er angitt for å sikre mitokondriell SNV-deteksjonsgrense (varianttypen med høyest følsomhet for kontaminasjon).

Ytelseskarakteristikk

Følgende valideringsstudier ble utført ved hjelp av TruSight Whole Genome arbeidsflyten som er beskrevet i [Bruksanvisning på side 15](#), og ble utformet for å sikre analysens robusthet mot vanlige variasjonskilder og for å gi anbefalinger for konsekvent ytelse. Disse studiene brukte de analytiske QC-metrikkspesifikasjonene beskrevet i [Tabell 8](#) som referanse for vellykket analyseytelse og som forutsetning for å etablere analytisk variantbetegnelsesytelse.

Krysskontaminasjon

Krysskontaminasjonsstudien vurderte feil deteksjon av Index Read (Indeksavlesning) på grunn av brønn-til-brønn-kontaminasjon under prøvebibliotekklargjøringen og kjøring-til-kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer. 24 blodprøver ble brukt til å evaluere krysskontaminering. Totalt 24 biblioteker ble klargjort av to operatører ved hjelp av S2-konfigurasjonsindekssettene 1–4, og sammenslåtte biblioteker ble sekvensert i rekkefølge etter indeks angitt på én NovaSeq 6000Dx Instrument. 16 biblioteker ble hver fremstilt av to operatører ved anvendelse av S4-konfigurasjonsindekssettene 1 og 2 i to replikater, og sammenslåtte biblioteker med alternerende indekssett ble sekvensert på samme NovaSeq 6000Dx.

For å evaluere krysskontaminering ble korrekte indeksavlesninger sammenlignet med indeksavlesninger fra nærliggende brønner for brønn-til-brønn-kontaminasjon og tidligere sekvenseringskjøring for kjøring-til-kjøring-kontaminasjon. Mengden kjøring-til-kjøring-kontaminasjon var $\leq 0,003178\%$ for S2 og $\leq 0,002487\%$ for S4-kjøringer. For å evaluere prøve-til-prøve-kontaminasjon ble kvalitetskontrollmetrikk for prøvebibliotek for estimert prøvekontaminering brukt. Mengden av prøve-til-prøve-kontaminasjon var 0,001, den laveste verdien rapportert av analyseprogramvaren. Disse resultatene indikerer at det er lav risiko for kontaminasjon i arbeidsflytene for bibliotekklargjøring og sekvensering.

I bruk og intermediær stabilitet

Bibliotekklargjøringsreagenser ble vurdert for stabilitet under bruk av settet, inkludert flere fryse-tine-hendelser og åpne-rør-stabilitet.

For testing av fryse-tine-syklus ble frosne komponenter utsatt for fem fryse-tine-hendelser for å støtte én utpakkingshendelse og fire hendelser for bruk av settet. For stabilitet under bruk ble volumet nødvendig for å klargjøre seks prøvebiblioteker fjernet ved hver av tre fryse-tine-sykluser for å simulere volumuttømming under bruk, og komponenter ble lagret i ytterligere 31 dager før testing. Ved testing med gDNA ekstrahert fra seks bloddonorer, besto alle data analysekontrollmetrikken for analyse. Disse resultatene indikerer at reagenser for klargjøring av frosne biblioteker kan brukes med opptil fire fryse-tine-sykluser og 30-dagers stabilitet i bruk.

Intermediær stabilitet ble vurdert for de enkelte bibliotekene og de sammenslåtte og denaturerte bibliotekene. Alle data besto analysekontrollmetrikk som indikerer opptil 14-dagers stabilitet for enkelt-bibliotek og opptil 30-dagers stabilitet for sammenslåtte og denaturerte bibliotek når de lagres frosset ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) som beskrevet i de sikre stoppunktene.

Blodprøvetaking og oppbevaring

Kompatibilitet med blodprøverør og prøveoppbevaring ble undersøkt med fire donorer og blod tatt i EDTA-prøvetakingsrør fra tre forskjellige leverandører. Genomisk DNA (gDNA) ble ekstrahert fra hver ved ankomst for tid-null og deretter igjen etter at blod ble oppbevart i 16, 33 og 43 dagers lagring ved 2 °C til 8 °C. Det ekstraherte gDNA-et ble oppbevart frosset (-25 °C til -15 °C) i elueringsbufferen (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) og deretter kvantifisert og anvendt for bibliotekklargjøring og sekvensering. Alle data besto analyseanalysekontrollmetrikk som indikerer analysekompatibilitet med tre forskjellige EDTA-blodprøvetakingsrør og blod oppbevart i opptil fem uker ved 2 °C til 8 °C.

Evaluering av DNA-ekstraksjonsmetode

Tre kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett ble evaluert for analyseytelse. To sett brukte magnetiske kuler, ett med og ett uten fast fase og cellulosebasert binding, og ett sett brukte en silikamembranbasert nukleinsyrerensningemetode ved hjelp av spinnkolonner ([Tabell 9](#)).

Evalueringen ble utført av to operatører med ett ekstraksjonsreagenser-parti per metode og fullblod tatt i EDTA-rør fra fire antatt friske donorer. Hver blodprøve ble ekstrahert fire separate ganger i henhold til produsentens instruksjoner over ikke-påfølgende dager med 16 samlede observasjoner per sett. Ekstrahert gDNA ble anvendt til å klargjøre biblioteker for sekvensering og analyse.

Alle observasjoner (16/16) for hver ekstraksjonsmetode besto analysens analytiske kontrollmetrikk. Analysens ytelse ble ikke påvirket av valg av prøve-gDNA-ekstraksjonsmetode. Analytisk nøyaktighet og reproduserbarhetsstudier brukte gDNA ekstrahert med sett 3 (silikafilterkolonneisolasjon med spinnkolonner).

Tabell 9 Ekstraksjonsmetoder testet for TruSight Whole Genome ytelse

Sett	Ekstraksjonsmetode
1	Magnetisk kuleekstraksjon med reversibel immobilisering i fast fase (SPRI)
2	Magnetisk kuleekstraksjon med mobil fast fase og cellulosebasert binding
3	Silikafilterkolonneisolasjon med spinnkolonner

DNA-innmatingsfølsomhet

Mengden gDNA-innmating som anbefales for testing per prøve, er 280 ng eller 350 ng, avhengig av DNA-kvantifiseringsmetodene oppført i [Anbefalinger for DNA-innmating på side 10](#).

For å bestemme ytelsen over et område med gDNA-innmatingkonsentrasjoner ble mengden DNA brukt i analysen testet ved nivåer i området $\pm 28,6\%$ av anbefalt innmating. Resultatene viste at -25% av anbefalt gDNA-innmating er en nedre grense for analysen. Analysen fungerer riktig med gDNA-innmating opptil $+28,6\%$ av anbefalt innmating.

Karakteriseringen av tre distinkte kvantifiseringsmetoder viste at ulike metoder har ulike variabilitetsnivåer og kan gi ulike resultater. Ved bruk av en annen metode enn de oppført i [Anbefalinger for DNA-innmating på side 10](#), er det mulig at målrettet gDNA-innmating må optimaliseres. Det anbefales at gDNA for prøver beregnet på

et bestemt bibliotekklargjøring-parti og sekvenseringskjøring kvantifiseres sammen for å eliminere variasjon fra parti-til-parti når det er mulig. Eller bruk av prosesskontroller for å sikre $\leq 25\%$ gDNA-kvantifisering av parti-til-parti-variabilitet.

Forstyrrende stoffer

Denne studien evaluerte ytelsen med både endogene og eksogene stoffer forbundet med humane blod- og blodprøverør. Bilirubin, hemoglobin og triglyserider ble valgt for evaluering for å simulere henholdsvis ikteriske, hemolyserte og lipemiske prøver. Biotin og EDTA ble valgt for evaluering på grunn av tilstedeværelsen i blod- og blodprøverør (BCT-er), og for potensiell innvirkning på analysekjemien. Stoffer ble tilsatt i donorblodprøvene før ekstraksjon enten direkte eller etter oppløsning i løsemiddel. Testkonsentrasjon og detaljer om spike-in for hvert stoff er gitt i følgende tabell.

Tabell 10 Interfererende stoffer testet for TruSight Whole Genome ytelse

Stoff	Testkonsentrasjon	Løsemiddel som brukes i Spike Solution (toppløsning)	% topp lagt til blod
Bilirubin (ukonjugert)	40 mg/dL (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4 %
Hemoglobin	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	I/A – Oppløst i blod	I/A – Oppløst i blod
Triglyserider	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100 % etanol	4 %
Biotin	0,00351 mg/ml ²	Vann	4 %
EDTA	5,4 mg/ml ³	Vann	3 %

¹ Konsentrasjonene ble valgt til å være de høyest observerte konsentrasjonene i henhold til «Tilleggstabeller for interferenstesting i klinisk kjemi, CLSI EP37-ED1:2018».

² Konsentrasjonen ble valgt til å være tre ganger den «Høyeste legemiddelkonsentrasjonen under terapeutisk behandling» angitt i «Tilleggstabeller for interferenstesting i klinisk kjemi, CLSI EP37-ED1:2018».

³ Konsentrasjonen ble valgt basert på EDTA-konsentrasjonen som varierer i blodprøvetakingsrør i området opptil 1,8 mg/ml og for å simulere en kort påfyllingshendelse en blodprøve på 33 % det nominelle BCT-volumet som fører til 3x høyere EDTA-konsentrasjon i blod tilsvarende 5,4 mg/ml.

Blod fra fire donorer ble brukt i testing. For hvert interfererende stoff ble en aliquot av fullblod fra hver donor tilsatt interfererende middel og deretter delt mellom fire gDNA-ekstraksjonsreplikater. En kontroll ble behandlet på samme måte uten stofftilsetning. De parede test- og kontrollbetingelsene ble behandlet for hver donor innenfor samme ekstraksjonshendelse, og det ekstraherte gDNA-et ble deretter behandlet innenfor én enkelt biblioteksklargjøring og sekvenseringshendelse. Det var ingen innvirkning på analyseytelsen og ingen bevis for interferens som respons på noen av stoffene som ble testet.

Ekvivalens for prøveindeksering

TruSight Whole Genome gir et valg mellom fire 6-pleksindekssett for S2-kjøringer eller to 16-pleksindekssett for S4-sekvenseringskjøringskonfigurasjoner. Analysen ble vist å gi tilsvarende ytelse når biblioteker sekvenseres på enten NovaSeq 6000Dx S2- eller S4-sekvenseringskjøringskonfigurasjonene. I tillegg ble både S2- og S4-kjøringskonfigurasjonene vist å oppnå > 95 % av prøvebibliotekene med minimum 35,0x dekning når de ble testet med de foreskrevne indekssettene. Dermed kan ulike indekssett og sammenslåing brukt for å sekvensere på S2- og S4-strømningscellene brukes om hverandre for å gi skalerbarhet for å imøtekomme fluktuering i prøvegjennomstrømning og gi fleksibilitet i laboratorieprosesser.

Analytisk ytelse

Innledende karakteriseringsstudier ble utført for å bestemme konfidensnivåtersklene for små varianter, grense for blank/grense for deteksjon for mitokondriale SNV-er og størrelsestersklene for nøyaktig påvisning av STR-ekspansjoner ved bruk av TruSight Whole Genome arbeidsflyten. Prøver som representerer variantklassene vurdert av TruSight Whole Genome ble inkludert i evalueringen av analytisk nøyaktighet og repeterbarhet, inkludert presisjon innen laboratoriet og ekstern reproducerbarhet. Analytisk ytelse rapporteres for sekvenseringskjøringer og prøver som besto alle kvalitetskontroller, bortsett fra de konstruerte blandingsprøvene som brukes til å vurdere mitokondriale SNV-er ved eller nær grensen for deteksjon som ikke besto kontaminasjonsmetrikken. Resultatene for hver av disse studiene er beskrevet i avsnittene nedenfor.

Innledende karakteriseringsstudier

Små varianters konfidensnivåbestemmelse

For denne studien ble en logistisk regresjonsmodell fokusert på svært reproducerbare og dårlig reproducerbare variantsteder fra 96 replikaer av NA12878 for å definere terskler for høye, middels og lave konfidensnivåer.

Høykonfidensbaser for en gitt varianttype er de der predikert reproducerbarhet innenfor laboratoriet oppfyller eller overstiger 99 % for en gitt scoreterskel, og prosentandelen av ikke-N-baser som tilfredsstillt dette kriteriet overstiger 30 %. Hvis en liten varianttype ikke har en scoreterskel som oppfyller disse kriteriene, vil denne varianttypen ikke ha et høyt konfidensnivå. Intermediære konfidensbaser er de der forutsagt reproducerbarhet innenfor laboratoriet oppfyller eller overstiger 95 % for en gitt scoreterskel og varianttype. Lave konfidensbaser er de der forventet reproducerbarhet innenfor laboratoriet er under 95 % for en gitt scoreterskel og varianttype. Variantbetegnelser for en bestemt varianttype med et høyt eller intermediær konfidensnivå inkluderer flertallet av %non-N-baser (dvs. ekskludert gap) (se tabell 6) og demonstrerer høy ytelse når vurdert mot små variantsannhetssett og i omfattende vurderinger av presisjon innen laboratoriet for NA12878-replikater.

Varianttype	Konfidensnivå	% ikke-N-baser
SNV	Høy	89,14 %
	Intermediær	3,30 %
	Lav	7,56 %
Korte delesjoner (1-5 bp)	Høy	90,88 %
	Intermediær	2,45 %
	Lav	6,67 %
Intermediære delesjoner (6-15 bp)	Intermediær	86,94 %
	Lav	13,06 %
Lange delesjoner (≥ 16 bp)	Intermediær	85,42 %
	Lav	14,58 %
Korte insersjoner (1-5 bp)	Høy	88,94 %
	Intermediær	4,61 %
	Lav	6,45 %
Intermediære insersjoner (6-15 bp)	Intermediær	89,37 %
	Lav	10,63 %
Lange insersjoner (≥ 16 bp)	Intermediær	48,92 %
	Lav	50,63 %

Mitokondriell SNV-bestemmelse for blindgrense/deteksjongrense

Blindgrense (LoB)- og deteksjongrense (LoD)-studier ble utført for mitokondriale SNV-er. For mitokondriell SNV-studien ble LoB vurdert ved hjelp av lokuser kjent for å ikke ha noen variant (dvs. referansebetegnelse). LoD er definert som allelfrekvensen til mtDNA SNV-varianten, der deteksjonsraten for den varianten er 95 %.

For å bestemme LoB og LoD for deteksjon av heteroplasmatiske mtSNV-er ble grundig karakteriserte gDNA-prøver fra to ulike bloddonorer blandet i en titreringsstudie til fem fortynningsnivåer med 20 replikater per fortynningsnivå. Fortynningsnivåene ble utformet for å målrette mtSNV-variantprosjenter (1,2-6 % VAF) for å etterligne ulike nivåer av mitokondriell heteroplasmie. Blandede gDNA-prøver ble behandlet og avlesningene ble ned-prøvet for å oppnå 500x gjennomsnittlig mitokondriell dekning. Totalt 42 konstruerte «heteroplasmiske» steder ble brukt i nedstrømsevaluering. En regresjonsanalyse ble brukt til å estimere de nødvendige blandingsforholdene målrette 1x LoD og 2x LoD for en undergruppe av mtSNV-er.

Posisjoner der gDNA fra begge blodprøver har referanseallelgenotyper ble evaluert for mtSNV-betegnelser som passerte filter med et ikke-referanseallel. Den falske positive raten ble beregnet som 0,8 %, i samsvar med en null-LoB-antakelse i henhold til «Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012» (Evaluering av deteksjonsevne for kliniske laboratoriemålingsprosedyrer, CLSI EP17-A2-ED1:2012). Hver av de 42 posisjonene ble analysert uavhengig ved hjelp av probitregresjon. LoD-

verdien ble definert som forventet VAF-verdi tilsvarende deteksjonsraten på 95 % (C95). Den samlede rapporterte LoD-verdien, definert som 95. persentil av LoD-verdiene fra sannhetsstedene, var 4,75 % VAF. Gjennomsnittet av fordelingen av absolutte forskjeller mellom observert og forventet VAF for alle observasjoner ble beregnet til 0,83 % med en øvre 95 % konfidensgrense på 0,86 % VAF.

Bestemmelse av STR-ekspansjonsterskel

På grunn av tekniske begrensninger av STR-er med spenn som overskrider sekvenseringsavlesningslengden (~135 bp), vil den observerte STR-lengden med TruSight Whole Genome ofte være et underestimat av sann lengde. Når den sanne STR-lengden overskrider median fragmentlengde (~330 bp), estimerer STR-lengden plataene. Av den grunn vurderer TruSight Whole Genome et målrettet sett med lokuser som analysen nøyaktig kan diskriminere STR-er med observerte lengder innenfor normal variasjon fra de med lengder større enn observert i en antatt sunn populasjon («ekspandert») (se [Tabell 2](#) for liste over lokuser vurdert av TruSight Whole Genome).

For å sikre samlet negativt prosentvis samsvar (NPA) på 95 % på tvers av alle STR-steder vurdert av TruSight Whole Genome, ble terskler for per-lokuser for betegnelse en ekspandert STR på det stedet angitt til å oppnå gjennomsnittlig 99,94 % NPA per sted. For å ta høyde for iboende variasjonen i STR-størrelsesestimerer innenfor en antatt sunn populasjon, ble terskler angitt basert på fordelingen av uavhengig observerte STR-lengder i det antatt friske 1000 Genomes Project-datasettet (2 504 prøver fra ulike populasjoner behandlet med DRAGEN 3,7,5 og ExpansionHunter 4,0,2).⁴

For å bekrefte tersklene etablert ved hjelp av 1000 Genomes Project-datasettet, ble ekstrahert gDNA fra 16 cellelinjereferanseprøver (Center for Disease Controls Genetic Testing Reference Material (Get-RM)-program) med en rekke uavhengig estimerte STR-størrelser behandlet med TruSight Whole Genome. 10 bibliotekreplikater for hver av de 16 prøvene ble fremstilt og testet av seks operatører for totalt 960 observasjoner, og STR-størrelser ble uavhengig estimert for hvert replikat. Den observerte frekvensen av falskt positive prøver på tvers av alle målrettede lokuser var 0,35 %.

Deteksjonsgrensen (LoD) ble estimert for de 28 målrettede STR-lokuser med cellelinjene testet basert på allel størrelsene observert med TruSight Whole Genome og allel størrelsene forventet basert på tidligere uavhengig karakterisering ([Tabell 11](#)). For utvalgte lokuser ble det bestemt en deteksjonsgrense for mer enn én STR på samme sted for totalt 35 STR-er. LoD er den estimerte størrelsen der forventet STR-ekspansjon detekteres for 95 % av allelene basert på en probit-modell med bekreftede terskler for å skille mellom normale og ekspanderte STR-størrelser. Dataene på alle steder med kjente allel størrelser ble slått sammen for å få LoD-estimerer for hvert sted basert på stedsspesifikk terskel for en ekspandert STR. FMR1-repetisjonslengden ble systematisk undervurdert sammenlignet med andre STR-er og krevde en tilpasset modell for å estimere LoD riktig.

Bekreftede stedsspesifikke terskler for ekspanderte STR-er, estimert forventet og observert LoD for målrettede steder og sykdomsterskelen basert på tilgjengelig litteratur (kun for illustrasjonsformål) for målrettede STR-steder er oppgitt i [Tabell 11](#). For STR-ekspansjoner lengre enn terskelen diktert av avlesningslengden, og som den forventede lengden ikke kan observeres direkte for, tilsvarer en observert lengde en gjennomsnittlig lengde som ville bli observert over flere sekvenseringskjøringer. For STR-ekspansjoner kortere enn terskelen diktert av avlesningslengden, er forventede og observerte lengder de samme.

Tabell 11 Oppsummering av estimert deteksjonsevne for TruSight Whole Genome målrettede STR-steder

Målrettet lokus ^a	Ekspandert STR-terskel (bp) basert på 1000 Genomes Project-datasett	Estimert LoD (forventet lengde, bp)	Estimert LoD (observert lengde, bp)	Sykdomsterskel (sann lengde, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
ATXN1	114	115	115	114 ^{7,8}
ATXN10	200	298	233	3995 ^{7,8}
ATXN2	102	102	102	105 ^{7,8}
ATXN3	135	189	182	180 ^{7,8}
ATXN7	60	60	60	111 ^{7,8}
ATXN7_GCC	93	101	101	N/A
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	N/A
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	N/A
CNBP_CAGA	68	80	80	N/A
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	N/A
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}
FXN_A	200	298	233	N/A
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	N/A
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹

Målettet lokus ^a	Ekspandert STR-terskel (bp) basert på 1000 Genomes Project-datasett	Estimert LoD (forventet lengde, bp)	Estimert LoD (observert lengde, bp)	Sykdomsterskel (sann lengde, bp) ^b
NIPA1	33	33	33	N/A
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	N/A
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	N/A
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Lokuser med alternative STR-er annoteres av LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (f.eks. ATXN7_GCC).

^b Sykdomsterskler er gitt kun for som illustrasjon basert på publisert litteratur; I/A (ikke aktuelt) i denne kolonnen indikerer at STR ikke kan assosieres med en publisert patogen ekspansjon.

^c 100 % av replikater av NA23378 detekterte en STR-ekspansjon i C9ORF72, noe som tyder på en tidligere ikke-karakterisert ekspansjon på det stedet i den prøven. Denne cellelinjeprøven ble ekskludert fra analysen.

^d Intermediære utvidelser kan også være assosiert med en fenotype.

Denne studien viste lignende presisjons- og nøyaktighetsprofiler for STR-størrelsesestimerer på tvers av ulike målrettede lokuser, der deteksjonsgrensen for STR-utvidelser i stor grad drives av valgt terskel (basert på størrelsesfordeling i 1000 Genomes Project-populasjonen) i stedet for av forskjeller i deteksjonskapasitet på tvers av steder. Alle estimerte LoD-verdier i den forventede lengdeskalaen var større enn lengdene sett i antatt friske populasjoner og lavere enn mange publiserte sykdomsterskler. Dette gjør tilknyttede terskler for STR-ekspansjonsbetegnelse nyttige for å markere gjentakelsen på et bestemt lokus som potensielt ekspandert. Terskler rapportert her ble brukt til å vurdere nøyaktigheten av STR-ekspansjonsdeteksjon.

Nøyaktighet

Analytisk nøyaktighet ble bestemt ved å sammenligne TruSight Whole Genome variantbetegnelser med resultater oppnådd ved hjelp av alternative metoder. Referansemetoder ble valgt basert på betydelig forskjell sammenlignet med TruSight Whole Genome, som bruker Nextera™ kulekoblet biblioteksklargjøring, tofarget sekvenseringskjemi på NovaSeq 6000Dx, og DRAGEN 3.9.5 for variantbetegnelse. En representativ tilnærming til validering av TruSight Whole Genome ble utført med prøver som representerte varianter på tvers av alle variantklassene inkludert i analysens utdata. Tilsammen 459 unike prøver som besto analytisk kvalitetskontroll, ble brukt til å evaluere nøyaktigheten til TruSight Whole Genome. Prøvene ble testet over tre partier med biblioteksklargjøringsreagenser og forbruksmateriell, fire partier med S4-sekvenseringssett, åtte operatører, fem NovaSeq 6000Dx Instruments og to interne steder. 31 uavhengige biblioteksammenslåinger ble klargjort og sekvensert.

Følgende tabell gir definisjoner av metrikk som er beregnet i nøyaktighetsstudier.

Begrep	Definisjon
Lavere konfidensnivå (LCL)	Ensidig 95 % lavere konfidensgrense ved bruk av Wilson-metoden.
Negativt prosentsamsvar (NPA) ¹	Prosent av negative steder som definert av referansemetoden, som er samsvarende identifisert som negative med TruSight Whole Genome.
Positivt prosentsamsvar (PPA) ²	Prosentandel av varianter betegnet i referansemetoden som samsvarer med TruSight Whole Genome.
Teknisk positiv prediktiv verdi (TPPV) ³	Prosentandel av varianter betegnet med TruSight Whole Genome hvilke er samsvarende betegnet i referansemetoden.

¹ For nøyaktighet for STR-ekspansjonsdeteksjon og nøyaktighet for SMN1-alleledeteksjon, NPA = sann negativ/(sann negativ + falsk positiv).

² For nøyaktighet for STR-ekspansjonsdeteksjon og nøyaktighet for SMN1-allelregistrering, PPA = sann positiv/(sann positiv + falsk negativ).

³ For nøyaktighet for STR-ekspansjonsdeteksjon og nøyaktighet for SMN1-alleledeteksjon, TPPV = sann positiv/(sann positiv + falsk positiv).

Liten variantnøyaktighet

Nøyaktigheten til liten variantbetegnelse ble vurdert ved hjelp av genomisk DNA ekstrahert fra perifert fullblod fra 195 antatt friske donorer. TruSight Whole Genome-variantbetegnelser ble sammenlignet med variantbetegnelser fra en klinisk validert helgenomsekvenseringstest utført ved Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA Laboratory som referansemetoden. Referansemetoden for helgenomsekvenseringsarbeidsflyt bruker en ligeringsbasert TruSeq™ PCR-fri bibliotekklargjøring, 4-farget sekvenseringskjemi på HiSeq™-sekvenseringssystem og DRAGEN 3.8.4 for variantbetegnelse. Inserter og delesjoner > 31 bp i størrelse ble ikke karakterisert i denne studien fordi de ikke ble validert i referansemetoden.

Et nøyaktighetssammendrag for alle små variantbetegnelser vises i [Tabell 12](#) og [Tabell 13](#).

Tabell 12 TruSight Whole Genome Assay Nøyaktighet for små varianter stratifisert etter konfidensnivå og størrelse (Putativt sunne blodprøver)

Undervari- anttype	Konfiden- snivå	Referanse- metode for samsvarende betegnelser	Referanse metode for eksklusive betegnelser	Analyse- samsvarende betegnelser	Analyseek- sklusive beteg- nelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-er	Høy	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Inter- mediær	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Lav	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)
Kort delesjon (1-5 bp)	Høy	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Inter- mediær	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Lav	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
Middels delesjon (6-15 bp)	Intermediær	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Lav	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
Lang sletting (16- 31 bp)	Inter- mediær	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Lav	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)
Kort inersjon (1-5 bp)	Høy	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Inter- mediær	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Lav	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)
Middels inersjon (6-15 bp)	Inter- mediær	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Lav	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)

Undervari- anttype	Konfiden- snivå	Referanse- metode for samsvarende betegnelser	Referanse metode for eksklusive betegnelser	Analyse- samsvarende betegnelser	Analyseek- sklusive beteg- nelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Lang insersjon (16– 31 bp)	Inter- mediær	159 927	3135	159 432	8639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Lav	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Tabell 13 Sammendrag av TruSight Whole Genome NPA for små variantbetegnelser stratifisert av konfidensnivå

Konfidensnivå	Samsvarende negative betegnelser	Referansemetode Eksklusive negative betegnelser	NPA (LCL)
Høy	202 276 243 790	127 465 816	99,9 % (99,9 %)
Intermediær	3 307 740 675	77 650 177	97,7 % (97,7 %)
Lav	3 653 569 580	439 038 662	89,3 % (89,3 %)

En supplerende nøyaktighetsstudie ble utført for å evaluere små variantdeteksjon med kommersielt tilgjengelige DNA-prøver med referansecellelinje (Coriell Institute for Medical Research) med velkarakteriserte betegnelsestett generert av Genome in a Bottle (GIAB) Consortium. For denne studien ble GIAB-betegnelsestettene brukt som referansemetode. Sannheten angitt i disse prøvene inkluderer insersjoner og delelsjoner større enn 31 bp, så større innsetninger og slettinger ble inkludert i denne vurderingen. Disse prøvene inkluderte HG001-005 og NA24695 med resultatene vist samlet i [Tabell 14](#).

Tabell 14 TruSight Whole Genome Assay Nøyaktighet for små varianter stratifisert etter konfidensnivå og størrelse (velkarakteriserte cellelinjeprøver)

Undervariantt type	Konfidensnivå	GIAB-samsvarende betegnelser	GIAB-eksklusive betegnelser	Analysesamsvarende betegnelser	Analyseeksklusive betegnelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-er	Høy	21 431 369	2552	21 439 303	3954	>99,9 % (>99,9 %)	>99,9 % (>99,9 %)
	Intermediær	908 172	1259	910 058	2175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
Kort delesjon (1-5 bp)	Høy	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Intermediær	423 547	788	437 019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	263 828	2624	281 217	2088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
Middels delesjon (6-15 bp)	Intermediær	142 671	238	144 997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	86 174	812	91 710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
Lang delesjon (≥ 16 bp)	Intermediær	34 414	315	34 580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	9985	393	10 212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Kort insersjon (1-5 bp)	Høy	927 288	221	925 787	271	>99,9 % (>99,9 %)	>99,9 % (>99,9 %)
	Intermediær	158 346	294	137 081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	93 857	2402	75 687	1427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)

Undervariantt ype	Konfidensni vå	GIAB- samsvaren de betegnelser	GIAB- eksklusiv e betegnelser	Analysesamsvare nde betegnelser	Analyseeksklus ive betegnelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Middels insersjon (6–15 bp)	Intermedi ær	91 117	116	89 054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	37 925	745	36 670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
Lang insersjon (≥ 16 bp)	Intermedi ær	11 081	46	11 110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	14 086	607	14 312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

Kopinumervariantnøyaktighet

Nøyaktigheten til CNV-betegnelsen ble vurdert ved hjelp av samme referansemetode og antatt friske bloddonorprøver (195) brukt til å vurdere liten variantbetegnelsesnøyaktighet. Hver CNV anses som detektert i anropssettet hvis minst 50 % av denne CNV-en dekkes av sammenslutningen av CNV-anrop av samme type (GEVINST/TAP) i samsvarende betegnelsett. TruSight Whole Genome definerer et sett med genomiske regioner ekskludert fra CNV-betegnelser basert på en vurdering av prøvedata fra 1 000 genomer og 77 antatt friske bloddonorer ved hjelp av metrikk relatert til dekningsdybdeavvik, dekningsvariansavvik og dekningsgap for å fastslå regioner av genomet som ikke er rapporterbare for CNV. CNV-betegnelser ble bare evaluert over genomiske regioner som var felles for både referansemetoden og TruSight Whole Genome. Et oppsummering av nøyaktighet for alle CNV-betegnelser vises i [Tabell 15](#) og [Tabell 16](#).

Tabell 15 TruSight Whole Genome Assay Nøyaktighet for CNV-er stratifisert etter størrelse og type

Størrelse	Type	Referanse- metode for samsvarende betegnelser	Referanse- metode for eksklusive betegnelser	Analysesam- svarende betegnelser	Analyseek- sklusive betegnelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10–25 kbp	GEVINST	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	TAP	4162	457	4155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)

Størrelse	Type	Referanse- metode for samsvarende betegnelser	Referanse- metode for eksklusive betegnelser	Analysesam- svarende betegnelser	Analyseek- sklusive betegnelser	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
25–50 kbp	GEVINST	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	TAP	1587	16	1622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50–100 kbp	GEVINST	228	0	187	20	>99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	TAP	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)
≥100 kbp	GEVINST	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	TAP	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
Samlet (alle CNV-er ≥ 10 kbp)	GEVINST	1397	216	1234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	TAP	7013	501	7043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tabell 16 Oppsummering av TruSight Whole Genome NPA for CNV-betegnelser

Størrelse	Type	Samsvarende negative betegnelser	Referansem metode for eksklusive negative betegnelser	Analyseeksklusive betegnelser	NPA (LCL)
Samlet (alle CNV-er \geq 10 kbp)	GEVINST	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99 % (> 99,99 %)
	TAP	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99 % (> 99,99 %)

Nøyaktighet for homozygositetskjøringer

Teknisk positiv prediktiv verdi (TPPV) for ROH-betegnelser ble vurdert ved bruk av samme referansem metode og antatt friske bloddonorprøver (195) som ble brukt i de små variant- og CNV-nøyaktighetsvurderingene. ROH-hendelser ble bestemt ved å identifisere regioner i genomet inneholdende en sekvens av homozygote SNV-betegnelser som mangler heterozygote SNV-er eller lange gap uten varianter. Slike frøregioner ble deretter ekspandert til venstre og høyre og vurdert for omgivende homozygote betegnelser eller tilstedeværelsen av heterozygote SNV-er. ROH-hendelser detektert av TruSight Whole Genome ble sammenlignet med SNV-betegnelser fra referansem metoden. En oppsummering av TPPV for ROH-betegnelser vises i [Tabell 17](#).

Tabell 17 TruSight Whole Genome Nøyaktighet for ROH-hendelser stratifisert etter størrelse

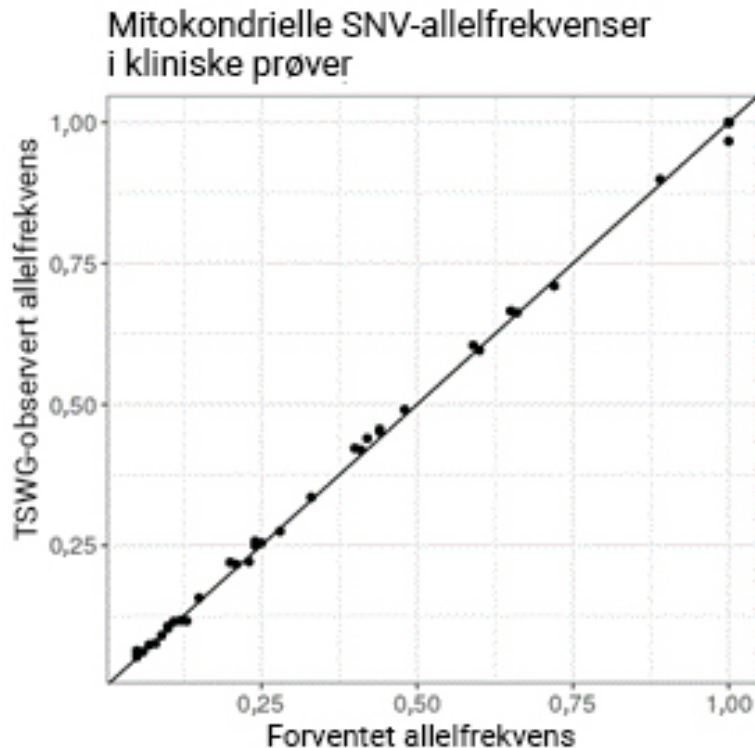
Størrelse	TPPV-gjennomsnitt	TPPV LCL
10–25 kbp	81,44 %	80,77 %
25–50 kbp	82,14 %	81,82 %
50–100 kbp	81,77 %	81,55 %
100–500 kbp	82,19 %	81,98 %
\geq 10 kbp	82,07 %	81,94 %
\geq 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Positivt samsvar i prosent (PPA) for ROH-deteksjon ble bestemt i kliniske prøver som ble eksternt hentet, ved å sammenligne TruSight Whole Genome betegnelser med ROH-betegnelser fra ortogonale metoder, inkludert kromosommikromatrise og PCR-basert vurdering. En ROH-hendelse ble ansett som detektert hvis minst 50 % av regionen rapportert som ROH av den ortogonale metoden overlappet sammenvoksingen av ROH-hendelser kalt av TruSight Whole Genome. PPA mellom TruSight Whole Genome Assay og ortogonale metoder var 34/34 (100 %) for alle forventede ROH-hendelser (\geq 4 Mb).

Nøyaktighet for heteroplasmisk mitokondriell SNV

Nøyaktigheten til mtSNV-betegnelsen ble vurdert i 41 tidligere kliniske prøver fra biobank hentet fra eksterne steder. Hver kliniske prøve inneholdt en tidligere rapportert mtSNV på et definert sted og med en definert grad av heteroplasmie basert på mtDNA-måttet kjent analyse med heteroplasmie (MITOP). Allelfrekvenser estimert av TruSight Whole Genome var sterkt korrelert med forventede frekvenser forutsagt av MITOP. Alle forventede mtDNA SNV-er ble detektert, noe som resulterte i en PPA på 100 % (41/41).

Figur 3 TruSight Whole Genome Observerte mitokondriale SNV-allelfrekvenser kontra forventede allelfrekvenser



En ekstra nøyaktighetsstudie av mtSNV ble utført ved bruk av de samme 195 blodprøvene og referansemetoden som beskrevet i nøyaktighetsstudiene for små varianter og CNV. Det negative referansesettet ble definert som sikre ikke-variantbetegnelser (BESTÅTT-filter), og det positive referansesettet ble definert som mtSNV-betegnelser med en allelfrekvens > 2,5 %. Posisjoner med enten et ikke-bestått-filter eller en ikke-SNV-variantbetegnelse ble ekskludert. Oppsummert nøyaktighet for mtSNV-er vises i [Tabell 18](#).

Tabell 18 TruSight Whole Genome Nøyaktighet for mtDNA SNV-betegnelser

Nøyaktighet smetrikk	Referanse metode samsvarende positiv	Referanse metode eksklusiv positiv	Analyse eksklusiv positiv	Referanse metode samsvarende negativ	Referanse metode eksklusiv negativ	Analyse eksklusiv negativ	Nøyaktighet metrik verdi (LCL)
PPA	6875	0	N/A	N/A	N/A	N/A	>99,99 % (99,96 %)
TPPV	6875	N/A	6	N/A	N/A	N/A	99,91 % (99,83 %)
NPA	N/A	N/A	N/A	3171049	24268	20564	99,24 % (99,23 %)

STR Expansion Detection Accuracy (Nøyaktig STR-ekspansjonsdeteksjon)

Nøyaktig STR-ekspansjonsdeteksjon var basert på totalt 160 prøver klargjort ved ekstraksjon av gDNA fra klinisk berørte personer med utvidelser på spesifikke steder bekreftet av PCR/Repeat-Primed (RP) (Repetisjonsprimet)-PCR eller Southern Blot utført i et CLIA-laboratorium. Terskelverdiene bestemt i [Tabell 11](#) ble anvendt for å definere STR-status for et allel på et spesifikt lokus som normalt (estimert STR-størrelse mindre enn eller lik terskelen) eller utvidet (større enn terskelen).

PPA ble beregnet ved anvendelse av kun klinisk bekreftede prøver, NPA ble beregnet ved anvendelse av kun individuelle antatt friske blodprøver, og TPPV ble beregnet på tvers av begge prøvegruppene. For alleler der en klinisk bekreftet prøve ikke var tilgjengelig, kunne ikke PPA beregnes. I tillegg, for alleler der en klinisk bekreftet prøve ikke var tilgjengelig og det ikke fantes noen falskt positive betegnelser, kunne ikke TPPV beregnes. NPA ble beregnet for alle STR-utvidelser. Antallet kliniske prøver som ble testet for en gitt STR-utvidelse og nøyaktighetsmetrikk, er oppgitt i [Tabell 19](#).

Tabell 19 TruSight Whole Genome Accuracy Metrics for STR Expansions (Nøyaktighetsmetrikk for STR-utvidelser)

STR-utvidelse	Kliniske prøver testet	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	N/A	N/A	>99,99 %
AR	8	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
ATN1	4	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %

STR-utvidelse	Kliniske prøver testet	PPA	TPPV	NPA
ATXN1	7	66,67 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN10	0	N/A	N/A	>99,99 %
ATXN2	5	80,00 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN3	9	>99,99 %	90,00 %	99,74 %
ATXN7	2	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
ATXN7_GCC	0	N/A	N/A	>99,99 %
ATXN8OS	0	N/A	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	N/A	N/A	>99,99 %
C9ORF72	21	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
CACNA1A	5	>99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP_CA	0	N/A	N/A	>99,99 %
CNBP_CAGA	0	N/A	N/A	>99,99 %
CSTB	0	N/A	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	N/A	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
FMR1	47	>99,9 %	>99,99 %	>99,99 %
FXN	0	N/A	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	N/A	N/A	>99,99 %
GLS	0	N/A	N/A	>99,99 %
HTT	10	>99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	N/A	N/A	>99,99 %
JPH3	0	N/A	N/A	>99,99 %
NIPA1	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOP56	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	N/A	N/A	>99,99 %
NOTCH2NL	0	N/A	N/A	>99,99 %
PABPN1	0	N/A	N/A	>99,99 %
PHOX2B	0	N/A	N/A	>99,99 %

STR-utvidelse	Kliniske prøver testet	PPA	TPPV	NPA
PPP2R2B	0	N/A	N/A	>99,99 %
TBP	0	N/A	N/A	>99,99 %
ALLE	160	98,12 %	92,35 %	99,94 %

Vurderingen av samlet PPA for påvisning av STR-ekspansjon på tvers av alle lokuser representerer en god tilnærming av lokusspesifikk PPA ved bruk av tilgjengelige kliniske prøver. Vurdering av PPA spesifikt for FMR1-lokuset kan tjene som en nedre grense for PPA lokuser som ikke ble direkte profilert på grunn av sin store terskel for STR-størrelsesabnormitet.

Nøyaktig SMN1-alleldeteksjon

Nøyaktig deteksjon av fraværet av C-allelet i SMN1 (NM_000344.3:c.840C) ble vurdert i 26 kliniske prøver fra tilfeller med diagnose av spinal muskelatrofi (SMA) og homozygot tap av ekson 7 i SMN1 bekreftet av digitaldråpe PCR eller MLPA. Nøyaktigheten av å identifisere tilstedeværelsen av SMN1 c.840C-allelet ble vurdert i antatt friske individuelle blodprøver. Hver prøve ble tildelt en enkelt statistisk metrikk (sann positiv (TP), falsk positiv (FP), falsk negativ (FN) eller sann negativ (TN)) basert på den detekterte tilstedeværelsen (negativ SMA-status) eller fraværet (positiv SMA-status) av C-allelet ved c.840-posisjonen til SMN1-genet sammenlignet med forventet status. PPA-, TPPV- og NPA-estimer ble gjort på tvers av både det positive og negative prøvesettet (se [Tabell 20](#)).

Tabell 20 Nøyaktighetsmetrikk for påvisning av fravær av SMN1 c.840C-alleler

Nøyaktighetsmetrikk	TP	FP	TN	FN	Nøyaktighetsmetrikkverdi
PPA	26	N/A	N/A	0	>99,99 %
TPPV	26	0	N/A	N/A	>99,99 %
NPA	N/A	0	195	N/A	>99,99 %

Repeterbarhet

Presisjon innen laboratoriet

Presisjon innen laboratoriet ble evaluert ved hjelp av ekstrahert gDNA med en rekke kjente varianter over hele genomet. Disse inkluderte mtSNV-er nær og godt over LoD, prøver som inneholdt SMN1 c.840C-allelet og prøver med FMR og HTT1 gjentar utvidelser ved lengder nær og godt over LoD. Prøvene ble testet med ni unike betingelser utformet med tre operatører, tre reagenspartier for biblioteksklargjøring, tre forbruksmateriell-partier for sekvensering og tre sekvenseringsinstrumenter.

Hver prøve ble kjørt i duplikat på samme kjøring for å vurdere variasjon innen kjøring, og hvert testkasus ble testet to ganger for to kjøring per betingelse for variasjon mellom kjøring. Hver prøve ble vurdert ved hjelp av 36 observasjoner, og utformingen ga 18 frihetsgrader for vurdering av repeterbarhet. Listen over

panelmedlemmer, prøvetype og vurderte varianter per panelmedlem vises i [Tabell 21](#). Prøvene 1–4 og 9–12 ble avledet fra både menn og kvinner av selvidentifisert kaukasisk, afrikansk og asiatisk opphav for gi et mangfoldig prøvesett.

Tabell 21 Prøvesammensetning av panel brukt til presisjonsstudie innen laboratorium

Panel	Prøvenr.	Prøvetype	Varianter
A	1	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	2	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	3	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	4	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	5	Konstruert blanding av gDNA fra blod	Mitokondrielle SNV-er ved lavt LoD-nivå
	6	Konstruert cellelinje NA20241 ¹	STR ekspandert i FMR1-lokuser ved lavt LoD-nivå
	7	Konstruert cellelinje NA20208	STR ekspandert i HTT-lokuser ved lavt LoD-nivå
	8	Konstruert cellelinje NA23686	Fravær av SMN1 c.840C

Panel	Prøvenr.	Prøvetype	Varianter
B	9	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	10	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	11	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	12	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspandert, tilstedeværelse av SMN1 c.840C
	13	Konstruert blanding av gDNA fra blod	mtSNV-er på høyt LoD-nivå
	14	Konstruert cellelinje NA07862	STR ekspandert i FMR1-lokuser ved høyt LoD-nivå
	15	Konstruert cellelinje NA20253	STR ekspandert i HTT-lokuser ved høyt LoD-nivå
	16	Konstruert cellelinje NA03814	Fravær av SMN1 c.840C

Høyt LoD-nivå: Variantalfrekvens ca. ved $2,0 \times - 4,0 \times$ LoD.

Lavt LoD-nivå: Variantalfrekvens ca. ved $1,0 \times - 1,5 \times$ LoD.

¹ Resultater for NA20241 ble ikke rapportert i endelige tall, da det ble fastslått å være signifikant under $1,0 \times$ LoD og dermed ikke oppfylte prøvekravene.

I den kvalitative vurderingen rapporteres reproduserbarhetsmetrikk som behandler variantene som kvalitative enheter (variant til stede eller variant ikke til stede). Ulike definisjoner av positive eller negative betegnelser og ulike kvalitative beregninger ble vurdert og rapportert for hver varianttype ([Tabell 22](#)). Ved vurdering av reproduserbarhet for betegnelser for små varianter, CNV og ROH ble variantbetegnelsene som ble gjort i et karakteriseringskjøringsreplikant, brukt for hver prøve som fungerte som sammenligningspunkt for alle andre replikater av den prøven i studien.

Tabell 22 Sammen drag av kvalitativ vurdering av reproduserbarhet for hver varianttype

Varianttype	Positiv	Negativ	Sammenligningstyp e	Kvalitativ metrikk
Små varianter	Variant- betegnelse passerer filtre	Homozygot referansebetegnelse som passerer filtre	Samsvar med betegnelsesett fra innledende karakterisering- skjøringer	Gjennomsnittlig positivt samsvar (APA) og gjennomsnittlig negativt samsvar (ANA)
CNV-er	CNV- betegnelse passerer filtre	Genomiske posisjoner overlapper ikke en kopinummervariantbetegnelse som passerer	Samsvar med betegnelsesett fra innledende karakterisering- skjøringer	APA og ANA
ROH	ROH- betegnelse	Genomiske posisjoner overlapper ikke en ROH- betegnelse	Samsvar med betegnelsesett fra innledende karakterisering- skjøringer	APA og ANA
STR- ekspan- sjon	Prøve med STR- ekspansjon i minst ett målrettet lokus	Prøve uten ekspansjoner i noen av de målrettede lokusene	Samsvar med prøvestatus definert ved karakterisering av prøve med ortogonalanalyse	Prosent positive betegnelser (PPC) og prosent negative betegnelser (PNC)
SMN1 c.840C- deteksjon	Prøve uten C-allelet ved c.840 posisjon for SMN1 (SMA- positiv)	Prøve som inneholder minst én kopi av C-allelet i posisjon c.840 av SMN1 (SMA- negativ)	Samsvar med prøvestatus definert ved karakterisering av prøve med ortogonalanalyse	PPC og PNC
mtSNV	Mitokondriell SNV- betegnelse passerer filtre	Ikke-variantposisjon i mitokondrialkromosom passerer filtre	Samsvar med variant- og ikke- variantbetegnelser laget i ufortynnede prøver	PPC og PNC

Den kvantitative vurderingen av de ulike varianttypene involverte en evaluering av variabilitet av enten kvantitative beregninger som understøtter de kvalitative betegnelsene eller, i tilfelle små varianter, av samsvarmetrikken i forhold til et referansebetegnelsessett. Denne studien utførte både en vurdering av total variabilitet i kvantitative beregninger på tvers av replikater, samt bidraget fra ulike faktorer inkludert i studien til variabiliteten i slike kvantitative beregninger gjennom Variance Components Analysis (variaskomponentanalyse). [Tabell 23](#) oppsummerer kvantitativ metrikk som brukes i analysen av hver varianttype, samt faktorene som ble vurdert for bidrag til variabilitet i kvantitativ metrikk.

Tabell 23 Sammendrag av kvantitativ metrikk brukt i vurdering av presisjon for ulike varianttyper

Varianttype	Kvantitativ metrikk	Faktorer vurdert for variasjonsbidrag
Små varianter	APA og ANA	Operatør, bibliotekklargjøringssett-parti, instrument, sekvenseringsforbruksmateriell-parti, undervarianttype, genomisk kontekst
CNV-er	Normalisert dekningsdybde over CNV-regionen	Operatør, bibliotekklargjøringssett-parti, instrument, sekvenseringsforbruksmateriell-parti, undervarianttype, variantlengde
ROH	ROH-score over ROH-region	Operatør, bibliotekklargjøringssett-parti, instrument, sekvenseringsforbruksmateriell-parti, undervarianttype, variantlengde
STR-ekspansjon	STR-størrelsesestimat	Operatør, bibliotekklargjøringssett-parti, instrument, sekvenseringsforbruksmateriell-parti, STR-sted, STR-lengde
SMN1 c.840C-deteksjon	Logg-sannsynlighetsforhold for tilstedeværelse av referanseallelet (C) på målposisjonen	Operatør, parti med bibliotekklargjøringssett, instrument, parti med forbruksmateriell for sekvensering, SMA-status
Mitokondriell SNV	Variantallelfrekvens.	Operatør, parti med bibliotekklargjøringssett, instrument, parti med forbruksmateriell for sekvensering, variantposisjon, forventet variantallelfrekvens

Resultatene for variaskomponentanalysen presenteres i [Tabell 24](#). For små varianter ble mesteparten av variansen tilskrevet restfeil og ikke forklart av de analyserelaterte faktorene inkludert i utformingen, inkludert sekvenseringssett-parti, sekvenseringsinstrument, bibliotekklargjøringssett-parti, operatør og kjøring-til-kjøring. Det ene unntaket ble observert for SNV-er i områder med intermedier konfidens der mesteparten av variansen ble tilskrevet sekvenseringssett-partiet. Generelt ble en høyere variansmengde tilskrevet analyserelaterte faktorer for små varianter i genomets lavkonfidensområder. For alle andre varianttyper ble mesteparten av variansen tilskrevet restfeil og ikke analyserelaterte faktorer. Denne studien demonstrerer at for de fleste små variantundertyper kan filtrering for områder med høy og intermedier konfidens i genomet brukes for å øke repeterbarheten og redusere analysevariabiliteten. [Ekstern reproducerbarhet på side 72](#) gir en omfattende analyse av analysens reproducerbarhet.

Tabell 24 Resultater av analysestudien for variasjonskomponenter

Metrikk	Varian- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
APA	Kort delesjon (1-5 bp)	Høy	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %

Metrikk	Variantdertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett-parti	Kjøring-til-kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekklargjøringssett)-parti	Operatør
		Intermediær	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %

Metrikk	Variantdertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett-parti	Kjøring-til-kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekklargjøringssett)-parti	Operatør
		Lav	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %

Metrikk	Variant- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
	Middels delesjon (6-15 bp)	Intermediær	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %

Metrikk	Variantdertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett-parti	Kjøring-til-kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekklargjøringssett)-parti	Operatør
		Lav	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %

Metrikk	Variant- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
	Lang delesjon (16-31 bp)	Intermediær	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Lav	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Kort insersjon (1-5 bp)	Høy	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Intermediær	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Lav	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %
	Middels insersjon (6-15 bp)	Intermediær	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Lav	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Lang insersjon (16-31 bp)	Intermediær	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Lav	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV	Høy	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %	3,17 %
		Intermediær	79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
		Lav	56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %

Metrikk	Variantdertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett-parti	Kjøring-til-kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekklargjøringssett)-parti	Operatør
ANA	SNV	Høy	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Intermediær	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Lav	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Metrikk	Variantendertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett-parti	Kjøring-til-kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekklargjøringssett)-parti	Operatør
Dybde	CNV-GEVINST (10 kbp, 25 kbp)	N/A	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %

Metrikk	Variant- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
	CNV- GEVINST (25 kbp, 50 kbp)	N/A	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %
	CNV- GEVINST (50 kbp, 100 kbp)	N/A	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV- GEVINST (100 kbp, 500 kbp)	N/A	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV TAP (10 kbp, 25 kbp)	N/A	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAP (25 kbp, 50 kbp)	N/A	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAP (50 kbp, 100 kbp)	N/A	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAP (100 kbp, 500 kbp)	N/A	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Metrikk	Variant- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
Score over region	ROH (1 kbp, 10 kbp)	N/A	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	N/A	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	N/A	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	N/A	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	N/A	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH \geq 500 kbp	N/A	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrikk	Variant- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
Størrelsesestimat for STR-lokuser ¹	AFF2	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_GCC	N/A	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	N/A	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	N/A	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	N/A	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	N/A	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	N/A	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	N/A	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	N/A	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	N/A	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrikk	Varian- tundertyper	Konfidensnivå	Rest	Sekvenseringssett- parti	Kjøring- til- kjøring	Instrument	Library Prep kit (Bibliotekk- largjøringssett) -parti	Operatør
Logaritmiske sannsynlighetsforhold	c.840C i NA03814	N/A	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C i NA23686	N/A	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV-er i nærheten av LOD	N/A	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

¹ Varianskomponentanalyse ble ikke utført for lokuser der det ikke ble observert varians.

Pakningsvedlegg

Ekstern reproduserbarhet

Ekstern reproduserbarhet ble bestemt ved bruk av ett enkelt parti med biblioteksklargjørings- og sekvenseringsreagenser på tre eksterne prøvesteder med to operatører på hvert sted. De samme prøvene som ble brukt i [Presisjon innen laboratoriet på side 55 \(Tabell 21\)](#) ble brukt i reproduserbarhetsstudien med ett unntak: prøven NA20241 ble erstattet med NA20239 for å evaluere FMR1-lokuser STR-ekspansjonen ved lav LoD. Til sammen ble 16 unike prøver testet som to underpaneler av åtte unike prøver hver (panel A og panel B) av hver operatør på hvert sted. Tre sekvenseringskjøringer ble utført for duplikatbiblioteker for hvert underpanel for til sammen 36 sekvenseringskjøringer per unik prøve.

Bestått-raten til prøver over 576 prøvebiblioteker med gyldige sekvenseringskjøringer, definert som antall prøver som besto kvalitetskontrollmetrikk for prøvebibliotek ved første forsøk, var 99,1 % (571/576; 95 % CI: 98,0 %, 99,6 %). Alle testresultater er basert på innledende testing.

Reproduserbarheten til SNV-er, insersjoner, delesjoner, CNV-er og ROH ble vurdert ved å sammenligne data med et referansebetegnelsessett basert på vanlig ytelse på tvers av tre karakteriseringskjøringer ([Tabell 25](#) og [Tabell 26](#)). Reproduserbarhet av STR-ekspansjoner, fraværet av SMN1 c.840C-allelet og mtSNV-er ble vurdert ved å sammenligne data med kjent status ([Tabell 27](#)).

Tabell 25 Reproduserbarhet TruSight Whole Genome for SNV-er, CNV-er og ROH

Varianttype – stratifisering	Samsvarende positive betegnelser ¹ / Positive betegnelser ²			Gjennomsnittlig positivt samsvar (%) (95 % CI) ³
	Sted 1	Sted 2	Sted 3	
Små varianter (høy konfidens)				
SNV-er	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001, 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9-99,9)
Inersjoner – 1-5 bp	34 087 135 /	33 025 772 /	34 089 204 /	99,9
	34 137 298	33 073 087	34 137 792	(99,9-99,9)
Delesjoner – 1-5 bp	44 096 186 /	42 733 935 /	44 102 515 /	99,6
	44 255 442	42 883 089	44 256 695	(99,6-99,6)
Små varianter (Intermediær konfidens)				
SNV-er	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8-98,9)
Inersjoner – 1-5 bp	11 075 073 /	10 734 488 /	11 080 468 /	98,9
	11 204 210	10 855 790	11 204 818	(98,9-99,9)
Inersjoner – 6-15 bp	4 307 181 /	4 173 626 /	4 308 408 /	99,3
	4 339 975	4 205 261	4 340 277	(99,2-99,3)
Inersjoner – ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612 877	632 498	(96,8-96,8)
Delesjoner – 1-5 bp	24 571 502 /	23 814 655 /	24 586 095 /	98,9
	24 851 492	24 076 930	24 855 041	(98,9-98,9)
Delesjoner – 6-15 bp	8 737 319 /	8 473 410 /	8 746 773 /	98,2
	8 900 796	8 624 403	8 902 016	(98,2-98,2)
Delesjoner – ≥ 16 bp	3 590 282 /	3 481 192 /	3 594 420 /	95,0
	3 779 907	3 662 448	3 780 659	(95,0-95,0)
Små varianter (lav konfidens)				
SNV-er	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2-81,2)

Varianttype – stratifisering	Samsvarende positive betegnelser ¹ / Positive betegnelser ²			Gjennomsnittlig positivt samsvar (%) (95 % CI) ³
	Sted 1	Sted 2	Sted 3	
Inersjoner – 1-5 bp	17 312 805 /	16 859 987 /	17 406 355 /	89,6
	19 370 351	18 807 745	19 418 516	(89,5-89,6)
Inersjoner – 6-15 bp	5 543 985 /	5 404 652 /	5 584 241 /	85,1
	6 529 886	6 338 556	6 550 066	(85,1-85,2)
Inersjoner – ≥ 16 bp	3 284 197 /	3 205 165 /	3 314 025 /	77,0
	4 275 286	4 158 315	4 298 399	(77,0-77,0)
Delesjoner – 1-5 bp	31 659 416 /	30 751 952 /	31 746 379 /	92,7
	34 194 748	33 158 757	34 226 245	(92,7-92,7)
Delesjoner – 6-15 bp	9 189 220 /	8 928 794 /	9 217 516 /	92,1
	9 987 568	9 684 179	9 995 101	(92,1-92,2)
Delesjoner – ≥ 16 bp	3 335 400 /	3 241 968 /	3 346 219 /	85,4
	3 909 364	3 791 331	3 912 857	(85,4-85,5)
CNV-er – gevinster ≥ 10 kbp	7883 /	7664 /	7916 /	95,5
	8275	8012	8282	(95,2-95,8)
CNV-er – tap ≥ 10 kbp	11 517 /	11 248 /	11 516 /	95,3
	12 089	11 777	12 113	(95,1-95,5)
ROH – ≥ 500 kbp	6641 /	6519 /	6616 /	98,0
	6765	6663	6756	(97,8-98,2)

1 Samlet antall samsvarende positive betegnelser = undersøkelsessamsvarende positiv (QCP) + referansesamsvarende positiv (RCP).

2 Samlet antall positive betegnelser = undersøkelsessamsvarende positiv (QCP) + undersøkelseseksklusiv positiv (QEP) + referansesamsvarende positiv (RCP) + referanseeksklusiv positiv (REP).

³ tosidig 95 % konfidensintervall beregnet via Wilson Score-metoden.

Tabell 26 Reproduserbarhet av TruSight Whole Genome for ANA av SNV-er, CNV-er og ROH

Varianttype – stratifisering	Samsvarende negative betegnelser ¹ / Negative betegnelser ²			Gjennomsnittlig negativt samsvar (%) (95 % CI) ³
	Sted 1	Sted 2	Sted 3	
Små varianter (høy konfidens)	486 282 620 918 /	470 948 205 740 /	486 285 759 770 /	>99,9
	486 388 081 375	471 054 131 230	486 389 857 817	(>99,9->99,9)
Små varianter (intermediær konfidens)	17 249 915 828 /	16 699 106 194 /	17 253 834 878 /	99,0
	17 427 817 811	16 874 794 553	17 429 035 482	(99,0-99,0)
Små varianter (lav konfidens)	24 072 615 254 /	23 454 103 344 /	24 180 801 788 /	94,0
	25 608 493 410	24 947 163 687	25 695 956 102	(94,0-94,0)
CNV-er – gevinster ≥ 10 kbp	592 486 270 144 /	573 973 293 084 /	592 487 297 632 /	>99,9
	592 500 222 476	573 985 772 396	592 500 614 241	(>99,9->99,9)
CNV-er – tap ≥ 10 kbp	592 548 802 882 /	574 030 570 254 /	592 547 683 360 /	>99,9
	592 559 825 216	574 041 311 257	592 559 141 007	(>99,9->99,9)
ROH – ≥ 500 kbp	542 968 586 606 /	525 724 060 526 /	543 014 319 116 /	99,2
	547 402 885 905	530 011 754 808	547 444 495 449	(99,2-99,2)

¹ Samlet antall konkordante negative betegnelser = 2 × samsvarende negativ (CN).

¹ Samlet antall samsvarende negative betegnelser = 2 × samsvarende negativ (CN) + referanseeksklusiv negativ (REN) + undersøkelseseksklusiv negativ (QEN).

³ tosidig 95 % konfidensintervall beregnet via Wilson Score-metoden.

Tabell 27 Reproduserbarhet av TruSight Whole Genome for STR-er, SMN1 og mtSNV-er

Varianttype – stratifisering	Samlet forventede positive betegnelser	Positive betegnelser			Samlet forventede negative betegnelser	Negative betegnelser			Prosent positive betegnelser (95 % CI) ¹	Prosent negative betegnelser (95 % CI) ¹
		Sted 1	Sted 2	Sted 3		Sted 1	Sted 2	Sted 3		
STR-ekspansjoner – høyt deteksjonsnivå (2x-4x LOD)										
STR-ekspansjoner – FMR1	35	12	11	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,1-100)	N/A
STR-ekspansjoner – HTT	36	12	12	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,4-100)	N/A
STR-ekspansjoner – FMR1 og HTT kombinert	71	24	23	24	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (94,9-100)	N/A
STR-ekspansjoner – lavt deteksjonsnivå (1x-1,5x LOD)										
STR-ekspansjoner – FMR1	36	11	10	11	N/A	N/A	N/A	N/A	88,9 (74,7–95,6)	N/A
STR-ekspansjoner – HTT	36	12	12	12	N/A	N/A	N/A	N/A	100 (90,4-100)	N/A

Varianttype – stratifisering	Samlet forventede positive betegnelser	Positive betegnelser			Samlet forventede negative betegnelser	Negative betegnelser			Prosent positive betegnelser (95 % CI) ¹	Prosent negative betegnelser (95 % CI) ¹
		Sted 1	Sted 2	Sted 3		Sted 1	Sted 2	Sted 3		
STR-ekspansjoner – FMR1 og HTT kombinert	72	23	22	23	N/A	N/A	N/A	N/A	94,4 (86,6-97,8)	N/A
STR-ekspansjoner – 28 STR-lokuser for hovedmål kombinert	N/A	N/A	N/A	N/A	285	96	93	96	N/A	100 (98,7-100)
Fravær av SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9-100)	100 (98,7-100)
mtSNV-er – høyt nivå (2x-4x LOD)	1080	360	360	360	457 524	152 491	152 489	152 484	100 (99,6-100)	>99,9 (>99,9- >99,9)
mtSNV-er – lavt nivå (1x-1,5x LOD)	1080	360	359	360	457 524	152 481	152 489	152 483	99,9 (99,5-99,9)	>99,9 (>99,9- >99,9)

¹ Tosidig 95 % konfidensintervall beregnet via Wilson-scoremetoden.

Feilsøking

Bruk følgende tabell til å feilsøke problemer i arbeidsflyten. Dersom en sekvenseringskjøring eller bibliotekklargjøring for en prøve mislykkes to ganger, kan det være nødvendig med ytterligere feilsøking. Kontakt Illumina tekniske støtte.

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Run Creation Issue (Kjøringsoppsettelsesproblem)	Den tilknyttede planlagte kjøringen kan ikke velges manuelt i NovaSeq 6000Dx-kontrollprogramvare etter innlasting av forbruksmateriell	Feil biblioteksør-ID ble spesifisert under kjøeringsplanlegging	Se Kjøringsrevisjon i Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringsproblem	Status for sekvenseringsfeil i Illumina Run Manager	Sekvenseringskjøringen ble avbrutt eller ble ikke fullført på grunn av NovaSeq 6000Dx eller problem med håndtering av sekvenseringsforbruksmateriell	Referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105). Etter å ha løst problemet, kan biblioteket slås sammen på nytt og sekvenseres på nytt opptil én gang (på grunn av volum).

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
		Kjøring fullført, men klarte ikke å klynge. Mulig NovaSeq 6000Dx problem, problem med håndtering av sekvenseringsforbruksmateriell eller feil ved katastrofal bibliotekklargjøring på grunn av problem med reagenshåndtering eller operatørfeil (f.eks. hoppet over et trinn eller forkastet i stedet for overført supernatant under størrelsesvalg)	<p>Vurder individuelle bibliotekutbytter i FLP med qPCR for $\geq 0,94$ nM (forutsatt 450 bp innsatsstørrelse) for å utelukke inn/ut bibliotekklargjøring kontra sekvenseringsrelaterte problemer.</p> <p>Hvis problemer med bibliotekklargjøring utelukkes og det mistenkes et sekvenseringsrelatert problem, referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Ved mistanke om et biblioteksklar-gjøringsproblem, gjennomgå Tips og teknikker på side 12 og Bruksanvisning på side 15 før du gjentar biblioteksklargjøring og sekvensering. Hvis det oppstår gjentatte feil, kontakt Illumina teknisk støtte.</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringsdata overføres ikke til server	Mislykket sekvensering av filoverføring for analyse-status i Illumina Run Manager	Problem med nettverkstilkobling, eller strømrubd på instrument eller server oppstod under dataoverføring	<p>Kontroller om det er strømrubd eller tap av nettverkstilkobling til instrumentet. Vent til systemet er inaktivt (fullført sekvensering), og gå deretter til Instrument Settings (Instrumentinnstillinger), IVD-INNSTILLINGER for å bekrefte tilkoblingen til spesifisert Output Location (Utdatsted) ved hjelp av Browse (Bla gjennom)-funksjonen.</p> <p>Hvis ytterligere feilsøking er nødvendig, se NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105). Hvis filoverføringen ikke starter på nytt og fullføres etter at tilkoblings- eller strømproblemer er løst, kontakter du Illumina teknisk støtte.</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Analysen starter ikke	Analyse ikke startet-status i Illumina Run Manager selv om sekvenseringsfiloverføring for analyse er fullført	Paring eller tilkobling mellom instrument og DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx tapt eller DRAGEN lisens utløpt.	<p>Vent til systemet er inaktivt (fullført sekvensering), og gå deretter til DRAGEN for å bekrefte at DRAGEN lisensen er gyldig. Hvis lisensen er utløpt, kontakt Illumina. Hvis lisensen er gyldig, velger du Run Self-Test (Kjør selvtest). Hvis testen mislykkes, eller hvis alternativet for å kjøre en selvtest ikke er tilgjengelig, logger du på Instrument for å se etter en feil relatert til serverparing. Referer til avsnittet System Configuration (Systemkonfigurasjon) i NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Analysen skal starte automatisk etter at problemet er løst. Gå ut av siden og naviger til fanen Active Runs (Aktive kjøring) for å bekrefte at analysen pågår. Kontakt Illumina hvis problemet vedvarer.</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Analysen blir sittende fast	Analyse pågår-status i Illumina Run Manager i mye lengre tid enn forventet	Nettverkstilkobling eller instrument- eller serverstrøm kan ha blitt forstyrret under analyse, noe som fører til at analysen setter seg fast	<p>Avbryt analysen og sjekk om det er strømbrudd eller tap av tilkobling til instrumentnettverket.</p> <p>Vent til systemet er inaktivt (fullført sekvensering), gå deretter til Instrument Settings (Instrumentinnstillinger) (IVD-INNSTILLINGER) og bekreft tilkoblingen til angitt utdatasted. Hvis ytterligere feilsøking er nødvendig, referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Etter å ha løst problemet, sett analysen tilbake i kø uten endringer. Se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Analysefiler overføres ikke	Analysefiloverføring til lagring mislyktes-status i Illumina Run Manager	Problem med nettverkstilkobling eller strømbrudd på instrument eller server oppstod under analysefiloverføring	<p>Avbryt analysen og sjekk om det er strømbrudd eller tap av tilkobling til instrumentnettverket.</p> <p>Vent til systemet er inaktivt (fullført sekvensering), gå deretter til Instrument Settings (Instrumentinnstillinger) (IVD-INNSTILLINGER) og bekreft tilkoblingen til angitt utdatasted. Hvis ytterligere feilsøking er nødvendig, referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Etter å ha løst problemet, sett analysen tilbake i kø uten endringer. Se Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).</p>
Analyse mislykkes etter å bli satt tilbake i kø	Analyse mislykkes etter å bli satt tilbake i kø	Hvis analysen settes tilbake i kø kan den opprinnelige kjøringen ha blitt slettet eller arkivert og er ikke lenger på stedet spesifisert for ekstern lagring	Kontroller at opprinnelige kjøring fortsatt er på eksternt lagringssted. Hvis arkivert, gjenopprett fra arkivet og sett deretter analysen tilbake i kø.

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sequencing QC fails (Kvalitetskontroll av sekvensering mislykkes)	Sammendrag av kvalitetskontrollresultat for sekvensering MISLYKTES i konsolidert rapport	«Samlet % \geq Q30» under analytisk spesifikasjon på grunn av feilhåndtering av sekvenseringsforbruksmaterieell (tinet ikke helt eller vendet ikke for å blandes etter tining)	Referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105). Etter å ha løst problemet, kan biblioteket slås sammen på nytt og sekvenseres på nytt opptil én gang (på grunn av volum).
FASTQ-kvalitetskontroll mislyktes for alle prøver	Oppsummert FASTQ kvalitets- kontrollresultat og Oppsummert mislykket kvalitetskontroll av prøvebibliotek, med individuelle kvalitetskontroll-metriske resultater for bibliotek rapportert som ND, for alle prøver i konsolidert rapport med oppsummert sekvenserings- kvalitetskontrollresultat BESTÅTT	Indeksadaptersett spesifisert under Create Run (Opprett kjøring) er ikke justert med det som ble brukt under biblioteksklargjøring	Vis prøver for å gjennomgå indeksinformasjonen brukt i analysen i IRM. Hvis korreksjon er nødvendig, se Requeue Analysis (Sett analyse tilbake i kø) i Veiledning for TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
FASTQ-kvalitetskontroll mislykkes for én eller flere prøver i fravær av lavt kjøringsutbytte; ikke-indeksert totalutbytte (GB) ≥ 2800 GB på S4 eller ≥ 1000 GB på S2	Oppsummert FASTQ-kvalitetskontrollresultat og Oppsummert kvalitetskontroll av prøvebibliotek MISLYKTES, med individuelle kvalitetskontrollmetrikkresultater for bibliotek rapportert som ND, for én eller flere, men ikke alle prøver i konsolidert rapport uten lavt kjøringsutbytte	Bruksfeil under bibliotekklargjøring eller -sammenslåing	<p>Vurder gjenværende volum i endelig bibliotekplate (FLP) for å bekrefte feil ved bruk av utelatelse av prøver fra sammenslåtte biblioteker. Volumet gjør det mulig for operatøren å slå sammen på nytt og sekvensere på nytt opptil én gang. Alternativt kan du sette mislykkede prøver i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring etter å ha gjennomgått Bruksanvisning på side 15.</p> <p>Som alternativ, vurder individuelle bibliotekutbytter i FLP med qPCR for $\geq 0,94$ nM (forutsatt 450 bp innsatsstørrelse) for å utelukke problemer relatert til biblioteksklargjøring. Sett mislykkede prøver tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring etter å ha gjennomgått Bruksanvisning på side 15.</p> <p>Det anbefales ikke å slå sammen biblioteker på tvers av biblioteksklargjøring-partier på grunn av svingninger i parti-til-parti-avkastning som kan føre til høyere %CV og høyere forekomst av mislykket «gjennomsnittlig</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
FASTQ-kvalitetskontroll mislykkes for noen ikke alle prøver med lavt kjøringsutbytte; ikke-indeksert totalutbytte (GB) lav, < 2800 GB på S4 eller < 1000 GB på S2	Oppsummert ASTQ-kvalitetskontrollresultat og Oppsummert kvalitetskontroll av prøvebibliotek MISLYKTES, med individuelle kvalitetskontrollmetrikkresultater for bibliotek rapportert som ND, for én eller flere, men ikke alle prøver i konsolidert rapport med lav kjøringsutbytte	Kan indikere et bibliotekklargjørings- eller sekvenseringsrelatert problem	<p>Vurder individuelle bibliotekutbytter i FLP med qPCR for $\geq 0,94$ nM (forutsatt 450 bp innsatsstørrelse) for å utelukke problemer relatert til bibliotekklargjøring og sekvensering.</p> <p>Hvis det er mistanke om et sekvenseringsproblem, referer til NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentasjon (dokumentnr. 200010105). Etter å ha løst problemet, kan biblioteker slås sammen på nytt og sekvenseres på nytt opptil én gang (på grunn av begrenset volum).</p> <p>Ved mistanke om et biblioteksklargjøringsproblem, gjennomgå Tips og teknikker på side 12 og Bruksanvisning på side 15 før du gjentar biblioteksklargjøring og sekvensering. Hvis det oppstår gjentatte feil, kontakt Illumina teknisk støtte.</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Kvalitetskontroll av bibliotek mislykkes på grunn av lav dekning	Oppsummering Resultat av kvalitetskontroll av prøvebibliotek MISLYKTES for en eller flere prøver i konsolidert rapport på grunn av gjennomsnittlig autosomaldekning, og/eller prosent av autosom med dekning større enn 20X og/eller gjennomsnittlig mitokondrielldekning over genom som ikke besto analytisk spesifikasjon	Problem med prøve kvalitet eller biblioteksklargjøring	<p>Utfør kvantifisering på nytt med prosesskontroller for å utelukke problemer relatert til DNA-inndata.</p> <p>Gjennomgå Tips og teknikker på side 12 og Bruksanvisning på side 15 før du setter mislykket prøve tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring. Hvis det er gjentatt(e) feil på samme prøve(r), kan dette indikere prøve kvalitetsproblem(er).</p> <p>Hvis feilen observeres igjen, men med forskjellige prøver, kan dette indikere et bibliotekklargjøring-relatert problem relatert til operatør, reagens, forbruksmateriell eller utstyr. Hvis problemet vedvarer, kontakter du Illumina teknisk støtte.</p>

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Kvalitetskontroll av bibliotek mislykkes basert på GC-partiskhet	Oppsummering Resultat av kvalitetskontroll av prøvebibliotek MISLYKTES for en eller flere prøver i konsolidert rapport på grunn av normalisert dekning ved 60 % til 79 % GC-beholdere og/eller normalisert dekning ved 20 % til 39 % GC-beholdere som ikke besto analytisk spesifikasjon	Overdreven ELM-overføring eller hoppet over vask som forårsaker GC-partiskhet i dekning	Gjennomgå Tips og teknikker på side 12 og Bruksanvisning på side 15 før du setter mislykket prøve tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring.
Bibliotekskvalitetskontroll mislyktes basert på kontaminering for en eller flere, men ikke alle prøver i kjøring	Oppsummering av MISLYKKET kvalitetskontrollresultat for prøvebibliotek for én eller flere, men ikke alle prøver i konsolidert rapport på grunn av estimert prøvekontaminering som ikke besto analytisk spesifikasjon	Kontaminert prøve eller endret ikke spisser under prøve- eller biblioteksklargjøring	Gjennomgå Tips og teknikker på side 12 og Bruksanvisning på side 15 før du setter mislykket prøve tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring. Hvis det er gjentatte feil for samme prøve, kan prøve-DNA være kontaminert.
Bibliotekskvalitetskontroll mislykkes basert på kontaminering for alle prøver i kjøring	Oppsummert kvalitetskontrollresultat for prøvebibliotek rapporteres som MISLYKKET for alle prøver i konsolidert rapport på grunn av estimert prøvekontaminering som ikke består analytisk spesifikasjon	Kontaminert reagens eller endret ikke spisser under prøvefortynning eller biblioteksklargjøring	Gjennomgå Tips og teknikker på side 12 for å unngå kontaminasjon. Sett mislykkede prøver tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-part og kjøring med nye prøvefortynninger og biblioteksklargjøringssett.

Problemtype	Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
ND-oppsummert Ploidy- resultat	Oppsummert Ploidy-resultat rapportert som ND (ikke fastslått) i konsolidert rapport	Kjønn ble oppført som ukjent under Create Run (Opprett kjøring)	Bekreft at «Gitt kjønnskromosom-ploidy» i konsolidert rapport var «Ukjent». Det anbefales å liste opp kjønn som «Mann» eller «Kvinn» i prøvedata når det er kjent under Create Run (Opprett kjøring).
		DRAGEN rapporterte et annet kjønns-ploidy-resultat enn XX eller XY, som XO eller XXY	Gjennomgå utdata for «Ploidy- estimering» av DRAGEN i konsolidert rapport.
DISKORDANT oppsummert ploidy- resultat	Oppsummert Ploidy-resultat rapportert som DISKORDANT i konsolidert rapport.	Potensielt prøvebytteproblem	Gjennomgå for å bekrefte at prøvedata angitt under Create Run (Opprett kjøring) var korrekt. Hvis feil, sett analysen tilbake i kø med endringer. Hvis riktig, og det er mistanke om et prøvebytteproblem, anbefales det å sette DISCORDANT- prøven(e) i tilbake i kø i neste biblioteksklargjøring-parti og kjøring for å unngå rapportering av feil resultater. Prøveprogramvaren håndhever ikke feil for en prøve med et DISKORDANT oppsummert ploidy-resultat.

Referanser

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med.* 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Tidligere TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat.* 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Epub 2022 21. april. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Epub 2010 24. feb. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28. oktober 1998 [oppdatert 16. november 2023]. I: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Epub 2015 20. okt. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 2011 21. sep. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Vitenskap.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet.* 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsi.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Epub 2007 19. nov. PMID: 18028412.
14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Epub 2012 30. mai. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.

15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Epub 2014 17. sep. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatick.* 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Epub 2012 19. sep. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratum i: *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Epub 2011 16. jun. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Hjernen.* 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Epub 2012 3. april. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Epub 2019 22. juli. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 2019 22. juli. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Epub 2003 17. mars. PMID: 12640453.

Vedlegg A

S4-indekssett 1

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

S4-indekssett 2

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

S2-indekssett 1

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

S2-indekssett 2

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

S2-indekssett 3

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

S2-indekssett 4

Indeksplatebrønn-ID	Indeksnavn	i7-baser	i5-baser
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Vedlegg B

Ytterligere beregninger for alternativ 1: 280 ng DNA-innmating for kvant og Qubit kvantifiseringsmetoder for bredt område

Beregning av konsentrasjonsgrensene for DNA-stamkonsentrasjon på 11,2 til 154,0 ng/μl:

Minimumskonsentrasjonen er basert på 280,0 ng DNA-innmating/25,0 μl volum = 11,2 ng/μl.

Basert på et minimum pipetteringsvolum på 2,0 μl er den maksimale konsentrasjonen $280 \text{ ng} \times 1,1$ (10 % overskudd)/2,0 μl = 154,0 ng/μl, i et totalt volum på 27,5 μl.

Eksempelberegninger med 280,0 ng DNA-innmating

Eksempel for DNA-stamkonsentrasjon = 95,0 ng/μl:

- DNA-stamvolum (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, runder til 3,24 μl for nøyaktig pipettering med P-10.
- Samlet volum med fortynt DNA fastsettes til 27,5 μl.
- RSB-volum (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, runder til 24,3 μl for nøyaktig pipettering med P-200.

Eksempel for DNA-stamkonsentrasjon = 308,0 ng/μl:

- DNA-stamvolum (μl) fikseres ved 2,0 μl
- Samlet volum med fortynt DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- RSB-volum (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Ytterligere beregninger for alternativ 2: 350 ng DNA-innmating for Accuclear ultrahøy sensitivitet kvantifiseringsmetode

Beregning av konsentrasjonsgrensene for DNA-stamkonsentrasjoner på 14,0 til 192,5 ng/μl:

Minimumskonsentrasjonen er basert på 350,0 ng DNA-innmating/25,0 μl volum = 14,0 ng/μl.

Basert på et minimum pipetteringsvolum på 2,0 μl er den maksimale konsentrasjonen $350 \text{ ng} \times 1,1$ (10 % overskudd)/2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Eksempelberegninger med 350,0 ng DNA-innmating

Eksempel for DNA-stamkonsentrasjon = 118,75 ng/μl:

- DNA-stamvolum (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, runder til 3,24 μl for nøyaktig pipettering med P-10
- Samlet volum med fortynt DNA fastsettes til 27,5 μl.
- RSB-volum (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, runder til 24,3 μl for nøyaktig pipettering med P-200.

Eksempel for DNA-stamkonsentrasjon = 308,0 ng/μl:

- DNA-stamvolum (μl) fikseres ved 2,0 μl
- Samlet volum med fortynnet DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- RSB-volum (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200050132 v00.1	Mai 2024	Korrigert innmatingsvolum for Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method (Accuclear kvantifiseringsmetode med ultrahøy sensitivitet).
Dokumentnr. 200050132 v00	April 2024	Første versjon.

Pakningsvedlegg

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og dets tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktene beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges nøyaktig og kun av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktene som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktene brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKKELEG FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTENE, SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTENE.

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTENE SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

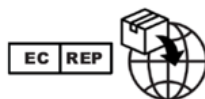
© 2024 Illumina, Inc. Alle rettigheter forbeholdt.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. For spesifikk informasjon om varemerker, se www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



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



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

Australsk sponsor

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

Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til support.illumina.com og lese under fanen *Documentation* (Dokumentasjon) for settet.