

NextSeq™ 550Dx-instrument

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK
KUN TIL EKSPORT

Katalognr. 20005715

Tilsigtet brug

NextSeq 550Dx-instrumentet er beregnet til sekventering af DNA-biblioteker ved brug af *in vitro*-diagnostiske analyser. NextSeq 550Dx-instrumentet skal anvendes med *in vitro*-diagnostiske reagenser og analysesoftware, som er specifikt registreret, certificeret eller godkendt dertil.

Procedureprincipper

Illumina NextSeq 550Dx-instrumentet er beregnet til sekventering af DNA-biblioteker med *in vitro*-diagnostiske analyser, og det er beregnet til brug af kvalificeret og uddannet klinisk laboratoriepersonale under brugen af *in vitro*-diagnostiske procedurer på et klinisk laboratorium. Inputtet til NextSeq 550Dx består af biblioteker, der er genereret fra DNA, med tilføjelse af prøveindekser og optagelsessekvenser til amplificerede mål. Prøvebibliotekerne indfanges på en flowcelle og sekventeres på instrumentet ved brug af SBS-kemi (Sequencing By Synthesis). SBS-kemien anvender en reversibel terminator-metode til at detektere fluorescensmærkede enkelt nukleotidbaser, når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Real-Time Analysis Software (RTA) udfører billedanalyse og basebestemmelse og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekventeringscyklus. Når den primære analyse er færdig, kan der udføres sekundær analyse på instrumentet for at behandle basebestemmelserne. NextSeq 550Dx anvender forskellige sekundære analysemoduler afhængigt af arbejdsgangen. Behandlingen i Germline eller Somatic Variant Modules omfatter demultiplexing, generering af FASTQ-filer, bestemmelse af variationer og generering af VCF- og gVCF-filer. VCF- og gVCF-filerne indeholder oplysninger om variationer fundet ved specifikke positioner i et referencegenom.

Dual boot-konfiguration

NextSeq 550Dx indeholder en dual boot-konfiguration, der gør det muligt at anvende instrumentet i to forskellige tilstande, enten Dx (diagnostisk brug) eller RUO (kun til brug inden for forskning). I den diagnostiske tilstand udføres *in vitro*-diagnostiske sekventeringsanalyser, inklusive Germline og Somatic Variant Modules. Der må kun anvendes *in vitro*-diagnostiske sekventeringsreagenser i diagnostisk tilstand. NextSeq 550Dx-instrumentets karakteristika for ydeevne og procedurebegrænsninger fastsættes ved hjælp af Germline og Somatic Variant Modules i diagnostisk tilstand.

Procedures begrænsninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- 2 Når Germline og Somatic Variant Modules anvendes sammen med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), er de i stand til at levere:
 - ▶ Sekventeringsoutput ≥ 90 gigabaser (Gb)
 - ▶ Læsningslængde (ved kørsel med parret afslutning) 2 x 150 basepar (bp)
 - ▶ Baser lig med eller over Q30 ≥ 75 % ved en læsningslængde på 2 x 150 bp
Mindst 75 % af baserne har kvalitetsscorer ≥ 30 på Phred-skalaen, hvilket viser, at nøjagtigheden for basebestemmelse er over 99,9 %.

- 3 Læsninger med indels (insertioner, deletioner eller kombinationer), hvor indholdslængden er >25 bp, bliver ikke tilpasset af analysesoftware. Som følge heraf detekterer prøvesoftware ikke indels med en længde på >25 bp.
- 4 Analysesoftware tilpasser muligvis ikke amplikonlæsninger med ekstrem variation i indholdet, hvilket medfører, at regionen rapporteres som en vildtype. Sådant ekstremt indhold omfatter:
 - ▶ Læsninger, der indeholder mere end tre indels
 - ▶ Læsninger med en længde på mindst 30 bp med enkelt nukleotidvariation (SNV)-indhold på >4 % af den totale amplikontargetlængde (eksklusive probeområder)
 - ▶ Læsninger med en længde på <30 bp med SNV-indhold >10 % af den samlede amplikonlængde (inklusive probeområder)
- 5 Store variationer, inklusive multinukleotid-variationer (MNV'er) og store indels, rapporteres muligvis som separate mindre variationer i VCF-outputfilen.
- 6 Deletionsvariationer kan blive frasorteret eller overset, hvis de spænder over to sideliggende amplikoner, og deletionslængden er over eller lig med overlappningen mellem de to amplikoner.
- 7 Systemet kan ikke detektere indels, hvis de støder direkte op til en primer, og der ikke er noget overlappende amplikon. For områder med overlappende amplikoner kan analysen ikke detektere deletioner, hvis området med overlappning er mindre end størrelsen på den pågældende deletion. Eksempel: Hvis området med overlappning mellem to sideliggende amplikoner er to baser, kan analysen ikke detektere nogen deletioner, inklusive begge disse baser. Deletion af en enkelt base på en af disse baser kan detekteres.
- 8 Ligesom det gælder for enhver anden hybridiseringsbaseret arbejdsgang til biblioteksklargøring, kan underliggende polymorfismer, mutationer, insertioner eller deletioner i oligonukleotidbindende områder påvirke de alleler, der undersøges, og de bestemmelser, der frembringes under sekventeringen. Eksempel:
 - ▶ En variation i fase med en variation i primerområdet forstærkes muligvis ikke, hvilket resulterer i en falsk negativ.
 - ▶ Variationer i primerområdet kan forhindre amplificering af referenceallelen, hvilket medfører ukorrekt bestemmelse af homozygotvariationen.
 - ▶ Indelvariationer i primerområdet kan forårsage et falsk positivt resultat ved enden af læsningen, der støder op til primeren.
- 9 Indels kan frasorteres på grund af strengpåvirkning, hvis de forekommer nær enden af en læsning, og er blevet blødt afkortet i forbindelse med tilpasning.
- 10 Små MNV'er er ikke blevet valideret, og de rapporteres kun i Somatic Variant Module.
- 11 Deletioner rapporteres i VCF på den foregående base pr. VCF-format. Derfor bør tilstødende variationer tages i betragtning, inden det rapporteres, at en individuel basebestemmelse er homozygot.
- 12 Kimcellespecifikke begrænsninger:
 - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet er designet til at levere kvalitative resultater vedrørende bestemmelse af kimcellevariationer (f.eks. homozygot, heterozygot, vildtype) ved brug af Germline Variant Module til NextSeq 550Dx i Local Run Manager.
 - ▶ Brug af Germline Variant Module kræver en minimal dækning pr. amplikon på 150x for at opnå nøjagtig variationsbestemmelse. Som følge heraf kræves 150 understøttende DNA-fragmenter, hvilket svarer til 300 overlappende læsninger med paired-end. Antallet af prøver og det samlede antal målrettede baser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomisk indhold kan påvirke dækningen.
 - ▶ Variation af kopiantal kan påvirke, hvorvidt en variation bliver identificeret som homozygot eller heterozygot.
 - ▶ Variationer i bestemt repetitiv kontekst filtreres fra i VCF-filerne. RMxN-gentagelsesfilteret anvendes til at frasortere variationer, hvis hele eller dele af variationssekvensen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variationens position. Ved bestemmelse af kimcellevariationer, skal der være mindst ni gentagelser i referencen, før variationen filtreres. Kun gentagelser med en længde på op til 5 bp tages i betragtning (R5x9).
 - ▶ En indel og en SNV ved en enkelt locus kan resultere i, at der kun rapporteres én variation.
- 13 Somatisk-specifikke begrænsninger.
 - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet er designet til at levere kvalitative resultater vedrørende somatisk

variationsbestemmelse (f.eks. forekomst af en somatisk variation med en variationsfrekvens, der er større end eller lig med 0,026 med en detektionsgrænse på 0,05) ved brug af Somatic Variant Module i Local Run Manager til NextSeq 550Dx.

- ▶ Brug af Somatic Variant Module kræver en minimal dækning pr. ampikon på 450x pr. oligonukleotidpulje for at opnå nøjagtig variationsbestemmelse. Som følge heraf kræves 450 understøttende DNA-fragmenter pr. oligonukleotidpulje, hvilket svarer til 900 overlappende læsninger med paired-end. Antallet af prøver og det samlede antal målrettede baser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomisk indhold kan påvirke dækningen.
- ▶ Hvad angår somatisk variationsbestemmelse, skal der være mindst seks gentagelser i referencen, før variationen filtreres, og kun gentagelser med en længde på op til 3 bp tages i betragtning (R3x6).
- ▶ Somatic Variant Module kan ikke skelne mellem kimcellevariationer og somatiske variationer. Modulet er designet til at detektere variationer på tværs af en række variationsfrekvenser, men variationsfrekvenser kan ikke anvendes til at skelne mellem somatiske variationer og kimcellevariationer.
- ▶ Normalvæv i prøven påvirker detekteringen af variationer. Den rapporterede detektionsgrænse er baseret på en variationsfrekvens i forhold til det samlede DNA, der er ekstraheret fra både tumor- og normalvæv.

Produktkomponenter

- 1 NextSeq 550Dx-instrument (katalognr. 20005715)
- 2 Softwarekomponenter til NextSeq 550Dx-instrumentet omfatter følgende:

Softwareprogram	Funktion	Beskrivelse
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Styrer driften af instrumentet	Softwareprogrammet NOS styrer driften af instrumentet under sekventeringen og genererer billeder til Real-Time Analysis Software (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Udfører primære analyser	Softwareprogrammet RTA konverterer de billeder, som NOS genererer af hver flise pr. cyklus i sekventeringskørslen, til filer til basebestemmelse, der fungerer som input til analysemodulerne i Local Run Manager. Softwareprogrammet RTA har ingen brugergrænseflade.
Local Run Manager	Grænseflade til valg af modul	Software Local Run Manager er integreret i instrumentet og anvendes til brugeradministration, valg af relevant analysemodul og statusovervågning.
Somatic Variant Module	Udfører sekundære analyser	Software i dette analysemodul i Local Run Manager behandler basebestemmelserne via sekundære analyser. Behandlingen omfatter demultiplexing, generering af FASTQ-filer, tilpasning, variationsbestemmelse og rapportering. Programmet til variationsbestemmelse (Pisces) genererer VCF-filer, som indeholder oplysninger om fundne variationer på bestemte steder i et referencegenom, inklusive den målte variationsfrekvens.
Germline Variant Module	Udfører sekundære analyser	Software i dette analysemodul i Local Run Manager behandler basebestemmelserne via sekundære analyser. Behandlingen omfatter demultiplexing, generering af FASTQ-filer, tilpasning, variationsbestemmelse og rapportering. Programmet til variationsbestemmelse (Pisces) genererer VCF-filer, som indeholder oplysninger om fundne variationer på bestemte steder i et referencegenom og klassificerer hver variation som heterozygot eller homozygot.

Driftsbetingelser

Element	Specifikation
Temperatur	Oprethold en laboratorietemperatur på 19 °C til 25 °C (22 °C ±3 °C). Denne temperatur er instrumentets driftstemperatur. Under en kørsel må omgivelsestemperaturen ikke variere mere end ±2 °C.
Luftfugtighed	Oprethold en ikke-kondenserende relativ fugtighed på 20-80 %.

Udstyr og materialer

Påkrævet udstyr og materialer, der sælges separat

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles), katalognr. 20028870

NextSeq 550DxHigh Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), katalognr. 20028871

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, der ikke medfølger

Brugerleverede materialer til sekventeringskørsler

Materiale	Leverandør	Formål
Spritservietter, 70 % isopropyl eller Ethanol, 70 %	VWR, katalognr. 95041-714 (eller tilsvarende) Almen laboratorieleverandør	Rengøring af flowceller og almene formål
Laboratorieserviet, fnugfri	VWR, katalognr. 21905-026 (eller tilsvarende)	Rengøring af flowceller og almene formål

Brugerleverede materialer til vedligeholdelse af instrumentet

Materiale	Leverandør	Formål
NaOCl, 5 % (natriumhypoklorit)	Sigma-Aldrich, katalognr. 239305 (eller produkt af tilsvarende laboratoriekvalitet)	Vask af instrumentet med manuel vask efter kørsel; fortyndet til 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalognr. P7949	Vask af instrumentet med en af mulighederne for manuel vask; fortyndet til 0,05 %
Vand, laboratoriekvalitet	Almen laboratorieleverandør	Afvaskning af instrumentet (manuel vask)
Luftfilter	Illumina, katalognr. 20022240	Rengøring af den nedkølingsluft, som instrumentet tager.

Retningslinjer for vand godkendt til laboratorier

Der skal altid anvendes vand af laboratoriekvalitet eller deioniseret vand til udførelse af procedurer på instrumentet. Brug aldrig postevand. Anvend kun vand af følgende kvalitet eller tilsvarende:

- ▶ Deioniseret vand
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18 megohms (MΩ) vand
- ▶ Milli-Q-vand
- ▶ Super-Q-vand
- ▶ Vand af molekylærbiologisk kvalitet

Advarsler og forsigtighedsregler

FORSIGTIG I henhold til amerikansk forbundslov må dette udstyr kun sælges på recept fra en læge eller anden behandler, med lovlig autorisation til at anvende eller ordinere anvendelse af udstyret i den stat, hvor han/hun praktiserer.

- 1 **Nogle af reagensdelene, der leveres af Illumina til brug sammen med NextSeq 550Dx-instrumentet, indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger.** Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- 2 Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og til de kompetente myndigheder i brugerens og patientens opholdsland.
- 3 Alle blodprøver skal håndteres som værende smitsomme med human immundefekt-virus (hiv), human hepatitis B-virus (HBV) eller andre blodbårne patogener (universelle forsigtighedsregler).
- 4 Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan resultere i fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat prøve kvalitet.
- 5 Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og reagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og reagenser.
- 6 Der skal anvendes korrekt laboratoriepraksis og god laboratoriehigiejne for at forhindre, at PCR-produkterne kontaminerer reagenser, instrumenter og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminering kan forårsage unøjagtige og upålidelige resultater.
- 7 For at forhindre kontaminering skal det sikres, at de områder, der anvendes før og efter amplificeringen, har udstyr og materialer, der er dedikeret til formålet (f.eks. pipetter, pipettespidser, varmeblokke, vortex-blandere og centrifuger).
- 8 Indekset til prøveparing skal matche det trykte pladelayout nøjagtigt. Local Run Manager udfylder automatisk de indeksprimere, der er knyttet til prøvenavnene, når de angives i modulet. Brugeren bør kontrollere de indeksprimere, der er knyttet til prøvene, inden sekventeringskørslen startes. Uoverensstemmelser mellem prøven og pladelayoutet resulterer i manglende positiv prøveidentifikation og rapportering af ukorrekte resultater.
- 9 Det tilrådes på det kraftigste at installere brugerleveret antivirus-software, for at beskytte computeren mod vira. Se installationsvejledningen i brugermanualen.
- 10 NextSeq 550Dx må ikke betjenes, hvis et eller flere af panelelementerne er blevet fjernet. Drift af instrumentet uden et eller flere af panelelementerne medfører potentiel eksponering for netspænding og DC-spænding.
- 11 Rør ikke ved flowcelleholderen i flowcellekammeret. Varmelegemet i dette kammer har en driftstemperatur på 22 °C til 95 °C og kan forårsage forbrændinger.
- 12 Instrumentet vejer ca. 185 lbs og kan forårsage alvorlig skade, hvis det tabes eller håndteres forkert.

Brugervejledning

Følgende instruktioner gælder for kørsel af Germline og Somatic Variant Modules i diagnostisk tilstand på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Angivelse af kørselsoplysninger

Du finder en detaljeret vejledning i NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet) (dokumentnr. 100000009513) og i vejledningen til det relevante modul i Local Run Manager.

Konfiguration af parametre

- 1 Log ind på Local Run Manager.
- 2 Vælg **Create Run** (Opret kørsel), og vælg **Somatic Variant** (Somatisk variant) eller **Germline Variant** (Kimbanevariant).
- 3 Indtast et kørselsnavn, der identificerer kørslen fra sekventering via analyse.
Brug alfanumeriske tegn, mellemrum, understregninger, binde- eller tankestreger.

- 4 **[Valgfri]** Indtast en kørselsbeskrivelse, der gør det nemmere at identificere kørslen.
Brug alfanumeriske tegn, mellemrum, understregninger, binde- eller tankestreger.
- 5 Vælg antallet af prøver og indekssættet på rullelisten.
Tag højde for følgende oplysninger, når du vælger.
 - ▶ Rullelisten indeholder antallet af prøver i et indekssæt. 24-Set 1 angiver f.eks. 24 prøver, der skal testes, med indekser fra indekssæt 1.
 - ▶ Indekssættallene henviser til forskellige sæt af i5 og i7-indekspar. Både sæt 1 og sæt 2 giver indeksdiversitet. To indekssæt tilbydes for at forebygge udtømmning af et enkelt sæt.
 - ▶ Vælg det antal prøver, der er tættest på det antal prøver, du tester. Hvis det præcise antal prøver ikke findes på listen, vælges det nærmeste antal, men under det antal du tester. Hvis du f.eks. vil teste 18 prøver, skal du vælge 16 prøver.
 - ▶ Foreslåede prøvebrønde og indekssæt kombinationer, der opfylder kravene til indeksdiversitet, er fremhævet med grøn.

Import af manifestfiler for kørslen

- 1 Sørg for, at de manifeste, som du ønsker at importere, ligger på en tilgængelig netværksplacering eller på et USB-drev.
- 2 Vælg **Import Manifests** (Importér manifeste).
- 3 Gå til manifestfilen, og vælg de manifeste, du vil tilføje.


BEMÆRK! Hvis du ønsker at gøre manifestfiler tilgængelige for alle kørsler via kimbanevariantmodulet eller det somatiske analysemodul, skal du tilføje manifesterne ved hjælp af funktionen Module Settings (Modulindstillinger). Denne funktion kræver tilladelse som administrationsbruger. For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrumentreferencevejledning (dokumentnr. 1000000009513)*.

Angivelse af prøver til kørslen

Angiv prøverne til kørslen ved hjælp af et af alternativerne og følgende vejledning.


- ▶ **Angiv prøverne manuelt** – Brug den tomme tabel på skærmen Create Run (Opret kørsel).
- ▶ **Importér prøver** – Gå til en eksterm fil i et kommasepareret værdiformat (*.csv). Du kan downloade en skabelon på skærmen Create Run (Opret kørsel).

Manuel indtastning af prøver

- 1 Indtast et unikt prøvenavn (**Somatisk variant-analysemodul**) eller prøve-id (**Kimbanevariant-analysemodul**).
Brug alfanumeriske tegn, binde- eller tankestreger eller understregninger.
- 2 **[Valgfrit]** Du kan vælge positive eller negative kontrolprøver ved at højreklikke, og vælge den ønskede kontroltype.
Kontrollen i én prøvebrønd udfylder automatisk den tilsvarende brønd i den anden pulje med samme kontrol.
- 3 **[Valgfri]** Indtast en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse)
Brug alfanumeriske tegn, binde- eller tankestreger eller understregninger.
- 4 Vælg en indeks 1-adapter på rullelisten indeks 1 (i7).
Når du anvender de foreslåede prøvebrønde, udfylder softwaren automatisk i7 og i5-indeksadaptere, der overholder kravene til indeksdiversitet. Hvis det præcise antal prøver, du tester, ikke findes på listen, skal du huske at vælge indekssæt til ekstra brønde.
- 5 Vælg en indeks 2-adapter på rullelisten indeks 2 (i5).
- 6 Vælg en manifestfil på Manifest-rullelisten.
Prøver i pulje A kræver et anden manifest end prøverne i pulje B.
- 7 Vælg et alternativ for at vise, udskrive eller gemme pladelayoutet som reference for klargøring af biblioteker:
 - Vælg ikonet  **Print** (Udskriv) for at vise pladelayoutet. Vælg **Print** (Udskriv) for at udskrive pladelayoutet.
 - Vælg **Export** (Eksportér) for at eksportere prøveoplysninger til en eksterm fil.

8 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Import af prøver

- 1 Vælg **Import Samples** (Importér prøver), og gå til den placering, hvor prøveoplysningsfilen ligger. Der er to typer filer, du kan importere.
 - Vælg **Template** (Skabelon) på skærmen Create Run (Opret skærm) for at lave en ny pladelayout. Skabelonfilen indeholder de rigtige kolonneoverskrift til import. Indtast prøveoplysninger i hver kolonne om prøverne i kørslen. Slet eksempeloplysninger i ubrugte celler, og gem derefter filen.
 - Brug en fil med prøveoplysninger, som er blevet eksporteret fra kimbanevariant- eller somatisk variantmodulet ved hjælp af funktionen Export (Eksportér).
- 2 Vælg ikonet  **Print** (Udskriv) for at vise pladelayoutet.
- 3 Vælg **Print** (Udskriv) for at udskrive pladelayoutet som reference til klargøring af biblioteker.
- 4 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Klargøring af reagenskassetten

Følg nedenstående anvisninger vedrørende reagenskassetten nøje for at opnå vellykket sekventering.

- 1 Tag reagenskassetten ud af fryseren (-25 °C til -15 °C).
- 2 Optø reagenserne ved hjælp af en af nedenstående metoder. Læg ikke kassetten i vand. Når kassetten er tøet op, skal du tørre den, inden du fortsætter til næste trin.

Temperatur	Optøningstid	Stabilitetsgrænse
Vandbad ved 15 °C til 30 °C	60 minutter	Maksimalt 6 timer
2 °C til 8 °C	7 timer	Maksimalt 5 dage

BEMÆRK! Optøningstiden er længere, hvis der optøs mere end én kassette i samme vandbad.

- 3 Vend op og ned på kassetten fem gange for at blande reagenserne.
- 4 Kontrollér bunden af kassetten for at sikre, at reagenserne er optøet og ikke indeholder bundfald. Kontrollér, at position 29, 30, 31 og 32 er optøet, da de er størst og er længst tid om at tø op.
- 5 Bank forsigtigt kassetten mod bordet for at fjerne luftbobler.
Fortsæt direkte til overførsel af prøven og konfiguration af kørslen for at opnå de bedste resultater.

Klargøring af flowcellen

- 1 Tag en æske med en ny flowcelle ud af køleskabet (2 °C til 8 °C).
- 2 Tag foliepakken ud af æsken, og lad den stå ved rumtemperatur i 30 minutter.

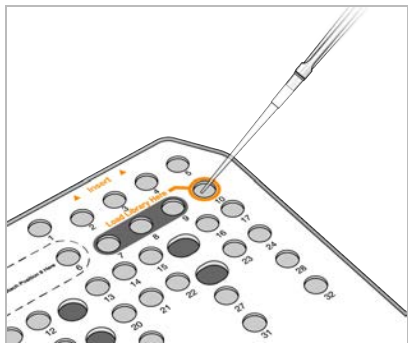
Klargøring af biblioteker til sekventering

Denaturer og fortynd bibliotekerne til en overførselsvolumen på 1,3 ml. I praksis kan overførselskoncentrationen variere afhængigt af biblioteksklargørings- og kvantificeringsmetoderne. Fortyndingen af prøvebiblioteker afhænger af kompleksiteten af oligonukleotidpuljerne. Du kan finde anvisninger i klargøring af prøvebiblioteker til sekventering, herunder biblioteksfortynding og puljeoprettelse, i brugervejledningsafsnittet for det pågældende biblioteksklargøringskit. NextSeq 550Dx kræver optimering af clusterdensiteten.

Overførsel af biblioteker til reagenskassetten

- 1 Rengør folieforseglingen, der dækker for reservoir nr. 10, som er mærket **Load Library Here** (Overfør bibliotek her), med en fnugfri serviet.
- 2 Prik hul på forseglingen med en ren 1 ml pipettespids.
- 3 Overfør 1,3 ml klargjorte biblioteker til reservoir nr. 10, der er mærket **Load Library Here** (Overfør bibliotek her). Undgå at røre ved folieforseglingen, når du hælder bibliotekerne i.

Figur 1 Overførsel af biblioteker



Konfiguration af en sekventeringskørsel

- 1 Log på NextSeq 550Dx med din adgangskode til Local Run Manager-softwaren.
- 2 Fra startskærmen i NOS-softwaren skal du vælge **Sequence** (Sekventer).
- 3 Vælg en kørsel på listen, og vælg så **Next** (Næste).
Der bliver åbnet en række skærme til kørselskonfiguration i følgende rækkefølge: Load Flow Cell (Overførsel af flowcelle), Load Buffer Cartridge (Overførsel af bufferkassette), Load Reagent Cartridge (Indlæsning af reagenskassette) og Pre-run Check (Forkørselskontrol).
- 4 Når skærmen Load Flow Cell (Overførsel af flowcelle) kommer frem, skal du rengøre og indlæse flowcellen.
 - ▶ Tag flowcellen ud af folieemballagen.
 - ▶ Åbn det klare plastiketui, og tag flowcellen ud.
 - ▶ Rengør flowcellens glasoverflade med en fnugfri alkoholserviet. Tør glasset med en fnugfri laboratorieserviet.
 - ▶ Kontrollér, at flowcellens glasoverflade er ren. Gentag om nødvendigt rengøringstrinnet.
 - ▶ Fjern den flowcelle, der blev brugt ved sidste kørsel.
 - ▶ Anbring flowcellen ret over justeringsstykkerne på platformen.
- 5 Vælg **Load** (Indlæs).
Døren lukker automatisk, flowcelle-id'et bliver vist på skærmen, og sensorerne bliver kontrolleret.
- 6 Følg software-anvisningerne vedrørende tømning af beholderen med brugte reagenser, indlæsning af NextSeq 550Dx-bufferkassetten og overførsel af NextSeq 550Dx-reagenskassetten.
Når NextSeq 550Dx-bufferkassetten og reagenskassetten er blevet overført, læser og registrerer softwaren RFID'en. Buffer- og reagenskassetens id'er bliver vist på skærmen, og sensorerne bliver kontrolleret.
- 7 Vælg **Start**, når den automatiske prækørselskontrol er færdig. (Ikke nødvendigt, hvis systemet er konfigureret til at starte automatisk.)
- 8 Skærmen Sequencing (Sekventering) åbner, når kørslen begynder. Skærmen giver et overblik over den igangværende kørsel, herunder intensiteter og kvalitetsgradueringer (Q-scorer).

Resultater

Real-Time Analysis (RTA) er en integreret software, der udfører billedanalyse og basebestemmelse og tildeler en kvalitetsgraduering til hver base for hver sekventeringscyklus. Når den primære analyse er færdig, begynder det valgte Local Run Manager-modul på NextSeq 550Dx-instrumentet automatisk den sekundære analyse. De sekundære analyseprocesser, der er beskrevet her, gælder for Germline og Somatic Variant Modules.

Demultiplexering

Demultiplexeringen sammenligner hver indeksslæsningssekvens med de indekssekvenser, der er angivet for kørslen. Ingen kvalitetsværdier tages i betragtning på dette trin.

Indekslæsninger identificeres ved hjælp af følgende trin:

- ▶ Prøver nummereres fra og med 1 baseret på den rækkefølge, de er anført i for kørslen.
- ▶ Prøve nummer 0 er forbeholdt klynger, som ikke er tildelt en prøve.
- ▶ Klynger tildeles en prøve, når indekssekvensen matcher præcist, eller når der er højst én uoverensstemmelse pr. indekslæsning.

Generering af FASTQ-fil

Efter demultipleksring genererer softwaren intermedieære analysefiler i FASTQ-formatet, der er et tekstformat, som bruges til at repræsentere sekvenser. FASTQ-filerne indeholder læsninger for hver prøve med tilhørende kvalitetsgradueringer. Klynger, som ikke passerede filteret, medtages ikke.

Hver FASTQ-fil indeholder kun læsninger for én prøve, og prøvens navn indgår i navnet på FASTQ-filen. I Germline og Somatic Variant Modules genereres otte FASTQ-filer pr. prøve pr. oligo-pulje, fire fra læsning 1 og fire fra læsning 2. Dette output giver i alt henholdsvis 8 og 16 FASTQ-filer pr. prøve for Germline og Somatic. FASTQ-filer er det primære alignmentinput.

Tilpasning

På tilpasningstrinnet sammenlignes klynger fra hver prøve med de amplikonsekvenser, der er specificeret i manifestfilen ved hjælp af Smith-Waterman-algoritmen.

Smith-Waterman-algoritmen foretager semiglobale tilpasninger af sekvenser for at klarlægge ens områder mellem to sekvenser. I stedet for at sammenligne hele sekvensen sammenligner Smith-Waterman-algoritmen segmenter af alle mulige længder.

Hver læsning med paired-end analyseres med hensyn til læsningens tilpasning med de relevante probesekvenser for den pågældende læsning.

- ▶ Læsning 1 analyseres i forhold til den omvendte komplement af den senere DLSO (Downstreams Locus-Specific Oligos).
- ▶ Læsning 2 analyseres i forhold til den tidligere ULSO (Upstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Hvis starten af en læsning matcher en sondesekvens med højst en uoverensstemmelse, tilpasses den fulde længde af læsningen med amplikon-målet for den pågældende sekvens.
- ▶ Hvis starten af en læsning matcher en probesekvens med højst tre forskelle (uoverensstemmelser eller 'skift' på grund af væsentlige indels), tilpasses den fulde længde af læsningen med amplikonmålet for den pågældende sekvens.
- ▶ På grund af prøvekemien observeres indels inden for DLSO og ULSO ikke.

Tilpasninger filtreres fra tilpasningsresultaterne på baggrund af uoverensstemmelsesrater, enten over interesseområdet eller hele amplikonet, afhængigt af amplikonlængden. De frafilterede tilpasninger skrives i tilpasningsfilerne som ikke-tilpassede og anvendes ikke til variationsbestemmelse.

Variationsbestemmelse

Programmet Pisces, der anvendes til variationsbestemmelse, er designet til bestemmelse af SNV- og indelvariationer i de klargjorte biblioteker på instrumentet.

Rapporter og yderligere outputfiler

Variationsanalysemodulerne opretter rapporter i PDF-format og tabulatorsepareret format (*.txt), der viser målinger såsom sekventeringsdybde og antal variationer. Modulerne opretter også outputfiler, såsom filer i formatet VCF og gVCF, til applikationer til variationsbestemmelse.

Kvalitetskontrolprocedurer

NextSeq 550Dx-softwaren vurderer hver kørsel, prøve og basebestemmelse i forhold til kvalitetskontrolmålinger. Det anbefales også at anvende positive og negative kontroller i forbindelse med biblioteksklargøring og at evaluere disse. Evaluér kontrollerne som følger:

- **Negative Control (No Template Control) (Negativ kontrol (Ingen skabelonkontrol)) eller anden negativ kontrol** – Skal generere det forventede resultat. Hvis den negative kontrol genererer et andet resultat end forventet, er der opstået en mulig fejl i prøvesporingen, ukorrekt registrering af indekseringsprimere eller kontaminering.
- **Positive Control Sample** (Positiv kontrolprøve) – Skal generere det forventede resultat. Hvis den positive kontrol genererer et andet resultat end forventet, er der opstået en mulig fejl i prøvesporingen eller ukorrekt registrering af indekseringsprimere.

Karakteristika for ydeevne

NextSeq 550Dx-instrumentets karakteristika for ydeevne blev bestemt ved brug af Germline og Somatic Variant Modules med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og bekræftet ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Studierne omfattede prøveindeksering, prøveoverførsel, DNA-input, analysefølsomhed (blindgrænse/detektionsgrænse), nøjagtighed, præcision, metodesammenligning og reproducerbarhed.

De analytiske studier ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) var designet til at evaluere krav til ydeevne, der tidligere var etableret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Resultaterne påviser, at ydeevnen for reagenskits (v2 og v2.5) kan sammenlignes ved hjælp af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Se indlægssedlen til *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* for karakteristika for ydeevne relateret til præanalytiske faktorer, såsom ekstraktionsmetoder eller interfererende stoffer.

Definition af anvendte beregninger vedrørende karakteristika for ydeevne

- 1 Den positive procentvise overensstemmelse (PPA) er beregnet som den andel af loci, der er klassificeret som variationer af en referencemetode, som analysen rapporterer korrekt.
 - ▶ $(\text{antal variationsloci, som analysen rapporterer korrekt}) / (\text{samlet antal variationsloci})$
Variationsloci, som analysen rapporterer i overensstemmelse med referencemetoden, er sandt positive (TP). Variationsloci, som analysen rapporterer som referencebestemmelser eller som anderledes variationsbestemmelser, er falsk negative (FN).
- 2 Den negative procentvise overensstemmelse (NPA) er beregnet som den andel af loci, der er klassificeret som vildtype af en referencemetode, som analysen rapporterer korrekt.
 - ▶ $(\text{antal vildtypeloci, som analysen rapporterer korrekt}) / (\text{samlet antal vildtypeloci})$
Vildtypeloci, som analysen rapporterer i overensstemmelse med referencemetoden, er sandt negative (TN). Vildtypeloci, som analysen rapporterer som variationer, er falsk positive (FP).
- 3 Den samlede procentvise overensstemmelse (OPA) beregnes som den andel af loci, som analysen rapporterer korrekt i forhold til en referencemetode.
 - ▶ $((\text{antal variationsloci, som analysen rapporterer korrekt}) + (\text{antal vildtypeloci, som analysen rapporterer korrekt})) / ((\text{samlet antal variationsloci}) + (\text{samlet antal vildtypeloci}))$
- 4 Beregningerne af PPA, NPA og OPA inkluderer ikke manglende bestemmelser (variations- eller referenceloci, der ikke opfylder et eller flere kvalitetsfiltre).
- 5 Den autosomale bestemmelsesrate er beregnet som det samlede antal loci, der passerer filtrene, divideret med det samlede antal sekventerede positioner for kromosom 1-22; kromosom X og Y er ikke medtaget. Denne måling tager ikke hensyn til bestemmelsesernes overensstemmelse med referencemetoden.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) Ydeevne

Prøveindeksering

Prøveindekseringsprimerne, som bliver tilføjet i løbet af biblioteksklargøringen, tildeler en unik sekvens til hvert prøve-DNA. Disse unikke sekvenser gør det muligt at samle flere prøver i en enkelt sekventeringskørsel. Der anvendes prøveindeksering i både den kimcellerelaterede og somatiske arbejdsgang. Formålet med dette studie var at bestemme det minimale (8) og maksimale (96) antal prøver, der kan behandles i en enkelt sekventeringskørsel på NextSeq 550Dx-instrumentet. Otte unikke Platinum Genome-prøver blev testet med 12 forskellige indekseringsprimerkombinationer pr. prøve. Prøveresultaterne fra fire sekventeringskørsler med Germline Variant Module blev sammenlignet med Platinum Genome-version 2016-1.0.

I de første fire kørselssæt blev 96 unikt indekserede prøvebiblioteker testet med en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge en række gener, der dækker 12.588 baser pr. streng på tværs af alle 23 humane kromosomer, for at verificere analysens evne til konsekvent at bestemme genotypen for en given prøve på tværs af forskellige indekseringsprimerkombinationer. I det andet kørselssæt blev otte unikt indekserede prøvebiblioteker sekventeret i to sekventeringskørsler for at verificere det minimale antal af understøttede indekser.

I kørslerne med 96 indekser varierende PPA for SNV'er fra 98,7 % til 100 %, PPA for insertioner og deletioner var 100 %, og NPA var 100 % for hver af de 96 indekserkombinationer. Kørslerne med otte indekser havde PPA-værdier på 100 % (SNV'er, insertioner og deletioner) og NPA på 100 % for hver af de otte indekserkombinationer.

Prøveoverførsel

NextSeq 550Dx-instrumentet gør det muligt at sekventere flere prøver og kontroller i en enkelt sekventeringskørsel. Der er gennemført et studie for at evaluere omfanget af prøveoverførsel i en sekventeringskørsel (i samme kørsel) og mellem flere sekventeringskørsler (fra kørsel til kørsel). To Platinum Genome-prøver, en mandlig og en kvindelig, blev testet med en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge gener, der dækker 12.588 baser (150 ampliconer) på tværs af 23 forskellige kromosomer, inklusive begge kønskromosomer. Bibliotekerne blev sekventeret på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af Germline Variant Module. Der blev konstateret overførsel af mandlige prøver til kvindelige prøver på baggrund af tilstedeværelse af Y-kromosomer i ampliconlæsninger af kvindelige prøver.

Overførsel i samme kørsel kan ske i forbindelse med generering af klynger, basebestemmelse af indekscyklusser og demultipleksning af prøver. For at teste prøveoverførslen i samme kørsel blev en bibliotekspulje bestående af 46 replikater af henholdsvis mandlige og kvindelige prøver plus fire kontroller uden skabelon sekventeret én gang på NextSeq 550Dx-instrumentet. Prøveoverførslen i samme kørsel blev vurderet ved at sammenligne Y-kromosomamplicondækningen i hvert kvindeligt replikat med den gennemsnitlige Y-kromosomamplicondækning i alle mandlige replikater i puljen. Den observerede gennemsnitlige overførsel i samme kørsel var 0,084 %.

For at teste prøveoverførslen fra kørsel til kørsel blev to bibliotekspuljer klargjort og sekventeret umiddelbart efter hinanden på ét NextSeq 550Dx-instrument. Den første pulje indeholdt 46 replikater af kvindelig prøve plus to kontroller uden skabelon. Den anden pulje indeholdt 46 replikater af mandlig prøve plus to kontroller uden skabelon. Der blev anvendt samme indeksadaptersæt til begge puljer. Den kvindelige pulje blev sekventeret først, hvorefter der blev kørt en sekventeringskørsel af den mandlige pulje, efterfulgt af en gentaget sekventeringskørsel af den kvindelige pulje. Prøveoverførslen fra kørsel til kørsel blev evalueret ved at sammenligne Y-kromosomamplicondækningen mellem de tilsvarende replikater i den gentagne kørsel af den kvindelige pulje og i kørslen af den mandlige pulje. Den observerede gennemsnitlige overførsel fra kørsel til kørsel var 0,0076 %.

DNA-input

Blod (kimcelle)

Inputområdet for blod-DNA for klargøring af bibliotek med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ved hjælp af arbejdsgangen i Germline Variant Module blev bestemt for NextSeq 550Dx-instrumentet. Dette interval blev evalueret ved at udføre et studie med seriel fortynding ved brug af 13 Platinum Genome-prøver og en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Biblioteket blev sekventeret på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved brug af ét parti NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Fem prøver blev testet i duplikat ved fem DNA-inputniveauer fra 250 ng til 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng og 12 ng). Otte prøver blev testet i et enkelt replikat ved hvert af de fem DNA-inputniveauer. Prøvegenotyperne blev sammenlignet med Platinum Genomes version 2016-1.0 for at bestemme nøjagtigheden. Resultaterne blev bestemt for hvert inputniveau. PPA for hver variationstype (SNV'er, insertioner og deletioner) er angivet i [Tabel 1](#); NPA er angivet i [Tabel 2](#). Nøjagtigheden var ensartet på alle inputniveauer. Det anbefalede DNA-input til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx er 50 ng, og den nedre og øvre grænse for opfyldelse af karakteristika for ydeevne er henholdsvis 25 ng og 100 ng.

Tabel 1 PPA-resultater for hvert DNA-input efter variationstype

DNA-input (ng)	Variationstype	Forventede variationer	TP	FN	Manglende variationsbestemmelser	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Insertion	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Deletion	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabel 2 NPA for hvert DNA-input

DNA-input (ng)	TN	FP	Manglende referencebestemmelser	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (Somatisk)

Det formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) DNA-inputområde for biblioteksklargøring med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ved brug af arbejdsgangen i Somatic Variant Module er fastsat for NextSeq 550Dx-instrumentet. DNA-inputområdet blev evalueret ved at udføre et studie med seriel fortynding ved brug af tre Platinum Genome-prøver og en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækker 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Platinum Genome-cellelinje GM12878 og GM12877 blev formalinfikseret og indlejret i paraffin efterfulgt af DNA-ekstraktion. GM12878 blev fortyndet med GM12877, således at VAF'er for 81 variationer (55 SNV'er, 10 insertioner og 16 deletioner) var nær 0,025; 0,05 eller 0,10. Derudover havde hver prøve 91 variationer med højere variationsfrekvenser på op til 1,0 VAF. Prøverne blev behandlet i duplikat ved fem DNA-inputniveauer med en gennemsnitlig delta-kvantitativ cyklus (dCq) på 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 og 7,8 i henhold til målinger med TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Hvert bibliotek blev sekventeret på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved brug af to partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). For at bestemme nøjagtigheden blev prøvernes variationsbestemmelser sammenlignet med Platinum Genomes version 2016-1.0. PPA for hver variationstype (SNV'er, insertioner og deletioner) er angivet i [Tabel 3](#); NPA er angivet i [Tabel 4](#). Det anbefalede DNA-input for variationer på 0,05 VAF eller derover er dCq \leq 4 med 4,6 som nedre grænse for opfyldelse af karakteristika for ydeevne.

Tabel 3 PPA-resultater for hvert DNA-input efter variationstype

Gennemsnitlig dCq	Variationstype	Forventede variationer	Forventede manglende bestemmelser	Målfortynding VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Manglende variationsbestemmelser	PPA (%)	Manglende variationsbestemmelser	PPA (%)	Manglende variationsbestemmelser	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ikke relevant.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Insertion	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Deletion	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabel 4 NPA for hvert DNA-input

Gennemsnitlig dCq	Forventet vildtype	Målfortynding VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Manglende referencebestemmelser	NPA (%)	Manglende referencebestemmelser	NPA (%)	Manglende referencebestemmelser	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

Analysefølsomhed (blindgrænse [LoB] og detektionsgrænse [LoD])

Dette studie blev gennemført for at evaluere blindgrænsen (LoB) og detektionsgrænsen (LoD) for Somatic Variant Module på NextSeq 550Dx-instrumentet. Studiet blev gennemført ved brug af en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækker 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Platinum Genome-cellelinje GM12878 og GM12877 blev formalinfikseret og indlejret i paraffin efterfulgt af DNA-ekstraktion. GM12878 blev fortyndet med GM12877, således at variationsfrekvenserne for 74 variationer (53 SNV'er, 7 insertioner og 14 deletioner) var $0,05 \pm 0,02$. GM12877 og fortyndet GM12878 (GM12878-D) blev testet over seks på hinanden følgende startdage med et enkelt instrument, hvor der blev skiftet mellem to partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklusser) og gennemført seks sekventeringskørsler i alt. Denne test resulterede i 60 replikater for hver variation i GM12878-D og 72 replikater for hvert tilsvarende vildtype-kordinat i GM12877 for hvert reagensparti. LoB og LoD blev beregnet ved brug af den klassiske, ikke-parametriske metode i CLSI EP17-A2. LoB og LoD blev beregnet separat for SNV'er, insertioner og deletioner ved at samle variationsfrekvenserne for en given variationstype. Type I-fejlen blev defineret som 0,01, og type II-fejlen blev defineret som 0,05.

For LoB blev de samlede variationsfrekvenser sorteret fra lavest til højest, og den 99. position for hvert reagensparti for hver variationstype blev beregnet (Tabel 5). Somatic Variant Module anvender en skæringsværdi (effektiv LoB) på 0,026 VAF til at bestemme den kvalitative detektering af variationer. Den beregnede LoB bekræftede, at denne skæringsværdi resulterer i en type I-fejl på højst 0,01.

Tabel 5 Blindgrænse

Variationstype	Observationer i alt	LoB reagensparti 1 (%)	LoB reagensparti 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Deletion	1008	1,20	1,20

For LoD blev procentdelen af individuel mutationsfrekvens for hvert reagensparti for hver variationstype under skæringsværdien på 0,026 beregnet (Tabel 6). Eftersom procentdelene var lavere end type II-fejlen på 5 % (0,05), blev medianen af de samlede variationsfrekvenser beregnet som LoD (Tabel 6). LoD for hver variationstype blev bestemt på baggrund af den højeste af de to beregnede værdier for de to reagenspartier – 4,97 % for SNV'er, 5,12 % for insertioner og 5,26 % for deletioner.

Tabel 6 Detektionsgrænse

Reagensparti	Variationstype	Observationer i alt	Antal VAF-målinger <2,6 %	% af VAF-målinger <2,6 %	Detektionsgrænse (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Deletion	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Deletion	840	7	0,80	5,26

Nøjagtighed

Kimcelle

Det følgende studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af bestemmelse af variationer for Germline Variant Module på NextSeq 550Dx-instrumentet ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). 13 unikke Platinum Genome-prøver blev testet ved hjælp af en repræsentativ analyse, der er designet til at undersøge en række gener, der dækker 12.588 baser (150 amplikoner) på tværs af 23 forskellige kromosomer. Der blev gennemført ni kørsler i alt ved brug af tre sekventeringsinstrumenter, tre reagenspartier og tre operatører over fem startdage. Nøjagtigheden af SNV'er, insertioner og deletioner blev bestemt ved at sammenligne resultaterne med en velkarakteriseret sammensat referencemetode, Platinum Genomes version 2016-1.0. Sikre genomområder blev defineret på baggrund af denne referencemetode, medmindre andet er angivet.

Tabel 7 Oversigt over kimcelleoverensstemmelse

Kriterier	Observationer i alt ¹	Resultat efter observation ²	Resultat efter kørsel ³
PPA for SNV	819	98,7	>99,9
PPA for insertioner	819	95,0	98,9
PPA for deletioner	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Beregnet som antal prøver pr. kørsel (91) x antal kørsler (9) = 819.

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle ni kørsler.

³Laveste værdi, når data fra hver kørsel analyseres samlet.

Tabel 8 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor resultaterne for variation bliver sammenlignet med Platinum Genomes version 2016-1.0 med henblik på PPA-beregninger. De tre variationstyper (SNV'er, insertioner og deletioner) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkelt nukleotidvariationer og insertioner/deletioner, bliver baseresultater uden variationer sammenlignet med det humane referencegenom hg 19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 8 Kimcelleoverensstemmelse pr. prøve

Sample (Prøve)	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	Forventede variationer ¹	TP	FN	Manglende variationsbestemmelser	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Samlet antal variationer i alle prøvereplikater på tværs af ni korsler.

Tabel 9 viser studiedataene pr. prøve, hvor resultaterne for variation sammenlignes med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode. Detekteringen er evalueret for hver variationstype – SNV'er, insertioner og deletioner – separat. Referencepositioner er ikke medtaget.

Tabel 9 Kimcelleoverensstemmelse pr. prøve efter variationstype

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

Prøverne blev desuden analyseret for at bestemme små insertioner og deletioner (indels). **Tabel 10** viser en overordnet oversigt. Der var i alt 71 indels, der varierede i størrelsen fra 1-24 bp for insertioner og 1-25 for deletioner.

Tabel 10 Oversigt over detektering af kimcelle-indel

Variationstype	Forventede variationer	TP	FN	Manglende variationsbestemmelser	PPA
Insertion	18522	18018	27	477	99,9
Deletion	17388	17073	0	315	100

Den repræsentative analyse bestod af 150 amplikoner, der var designet til at dække forskelligt genomindhold. GC-indholdet i amplikonerne varierede fra 0,19-0,87. Amplikonerne havde også en række enkeltnukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotid-gentagelser. Dataene blev kompileret pr. amplikon (Tabel 11) for at klarlægge genomindholdets indvirkning på procentdelen af korrekte bestemmelser. Procentdelen af korrekte bestemmelser består af variations- og referencebestemmelser og er under 100 %, hvis der er ukorrekte eller manglende bestemmelser.

Tabel 11 Nøjagtighed på kimcelle-amplikon-niveau

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), indel	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragment-størrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A (IKKE RELEVANT)	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A (IKKE RELEVANT)	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A (IKKE RELEVANT)	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A (IKKE RELEVANT)	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelse	% korrekte bestemmelser
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A (IKKE RELEVANT)	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A (IKKE RELEVANT)	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A (IKKE RELEVANT)	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A (IKKE RELEVANT)	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A (IKKE RELEVANT)	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A (IKKE RELEVANT)	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A (IKKE RELEVANT)	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A (IKKE RELEVANT)	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A (IKKE RELEVANT)	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A (IKKE RELEVANT)	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N/A (IKKE RELEVANT)	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A (IKKE RELEVANT)	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A (IKKE RELEVANT)	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N/A (IKKE RELEVANT)	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A (IKKE RELEVANT)	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A (IKKE RELEVANT)	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A (IKKE RELEVANT)	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A (IKKE RELEVANT)	0,55	0	0	0	N/A (IKKE RELEVANT)

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A (IKKE RELEVANT)	0,48	0	0	0	N/A (IKKE RELEVANT)
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	N/A (IKKE RELEVANT)

Sekventeringsresultaterne af prøve NA12878 blev sammenlignet med en genotype med høj sikkerhed for NA12878, som er udviklet af National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). 92 ud af de 150 amplikoner var helt inden for genomområderne med høj sikkerhed, 41 amplikoner havde delvis overlapning, og 17 amplikoner havde ingen overlapning i NIST-sekvensen. Dette resulterede i 10.000 koordinater pr. replikat til sammenligning. Basebestemmelser uden variationer blev sammenlignet med det humane referencegenom hg19. Resultaterne vedrørende nøjagtighed er vist i [Tabel 12](#).

Tabel 12 Kimcelleoverensstemmelse mellem prøve NA12878 og NIST-databasen

Prøve	Antal amplikoner	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Baseret på dataene fra dette studie af kimgener med ni kørsler kan NextSeq 550Dx-instrumentet konsekvent sekventere:

- ▶ GC-indhold $\geq 19\%$ (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner med 19% GC-indhold blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på $0,6\%$)
- ▶ GC-indhold $\geq 87\%$ (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner med 87% GC-indhold blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)
- ▶ PolyA-længder ≤ 9 (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyA-gentagelse på ni nukleotider blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)
- ▶ PolyT-længder ≤ 10 (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyT-gentagelse på ti nukleotider blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)
- ▶ PolyG-længder ≤ 7 (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyG-gentagelse på syv nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på $1,0\%$)
- ▶ PolyC-længder ≤ 6 (alle bestemte baser i 2457 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyC-gentagelse på seks nukleotider blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)
- ▶ Dinukleotid-gentagelse-længder $\leq 11x$ (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en $11x$ dinukleotid-gentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på $0,5\%$)
- ▶ Trinukleotid-gentagelse-længder $\leq 5x$ (alle bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en $5x$ trinukleotid-gentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på $0,5\%$)
- ▶ Insertionslængder ≤ 24 (66343 ud af 66370 bestemte baser i 819 sekventerede amplikoner indeholdende en insertion på 24 nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på $1,2\%$; der var ingen ukorrekte bestemmelser i området indeholdende insertionen på 24 nukleotider)
- ▶ Deletionslængder ≤ 25 (alle bestemte baser i 2457 sekventerede amplikoner indeholdende en deletion på 25 nukleotider blev korrekt bestemt med nul manglende bestemmelser)

Somatisk

Nedenfor beskrives studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af bestemmelse af variationer med Somatic Variant Module på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

I dette studie blev der anvendt en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge en række gener, der dækker 12.588 baser (150 amplikoner) på tværs af 23 forskellige kromosomer. Der blev ekstraheret Platinum Genome-DNA fra FFPE-behandlede blokke for at generere og evaluere seks unikke prøver i dette studie.

DNA fra prøve GM12877 blev fortyndet med DNA fra prøve GM12878 DNA for at oprette GM12877-D5 og GM12877-D7 som et sæt unikke heterozygote variationer med variationshyppigheder nær 5% og 7% . DNA fra prøve GM12878 DNA blev på samme vis fortyndet med DNA fra prøve GM12877 for at oprette GM12878-D5 og GM12878-D7. Hver prøve blev testet i triplikat, med undtagelse af de fortyndede prøver, som blev testet i replikater af seks. Der blev gennemført ni kørsler i alt ved brug af tre sekventeringsinstrumenter, tre reagenspartier og tre operatører over fem startdage. Nøjagtigheden af SNV'er, insertioner og deletioner blev bestemt ved at sammenligne resultaterne med en velkarakteriseret, sammensat referencemetode, Platinum Genomes version 2016- 1.0. Konfidente genomområder blev defineret baseret på denne referencemetode, medmindre andet er angivet.

Tabel 13 Oversigt over somatisk overensstemmelse

Kriterier	Observationer i alt ¹	Resultat efter observation ²	Resultat efter kørsel ³
PPA for SNV	378	98,9	99,9
PPA for insertioner	378	96,9	99,9
PPA for deletioner	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Beregnet som antal prøver pr. kørsel (42) x antal kørsler (9) = 378.

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle ni kørsler.

³Laveste værdi, når data fra hver kørsel analyseres samlet.

Tabel 14 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor resultaterne for variation sammenlignes med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode med henblik på PPA-beregninger. De tre variationstyper (SNV'er, insertioner og deletioner) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkelt nukleotidvariationer og insertioner/deletioner, bliver baseresultater uden variationer sammenlignet med det humane referencegenom hg 19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 14 Somatisk overensstemmelse pr. prøve

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

Tabel 15 viser studiedataene pr. prøve, hvor resultaterne for variation sammenlignes med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode. Detekteringen er evalueret for hver variationstype – SNV'er, insertioner og deletioner – separat. Referencepositioner er ikke medtaget.

Tabel 15 Somatisk overensstemmelse pr. prøve efter variationstype

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

De ti prøver blev desuden analyseret for at bestemme små insertioner og deletioner (indels) (Tabel 16). Der var i alt 71 indels, der varerede i størrelsen fra 1-24 bp for insertioner og 1-25 for deletioner.

Tabel 16 Somatisk oversigt over indel-detektering

Variationstype	Forventede variationer	TP	FN	Manglende variationsbestemmelser	PPA
Insertion	10773	10282	9	482	99,2
Deletion	11502	10667	5	830	>99,9

De 150 amplikoner var designet til at dække forskelligt genomindhold. GC-indholdet i amplikonerne varierede fra 0,19-0,87 %. Amplikonerne havde også en række enkeltnukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotid-gentagelser. Dataene blev kompileret pr. amplikon (Tabel 17) for at klarlægge genomindholdets indvirkning på procentdelen af korrekte bestemmelser. Procentdelen af korrekte bestemmelser består af variations- og referencebestemmelser og er under 100 %, hvis der er ukorrekte eller manglende bestemmelser.

Tabel 17 Nøjagtighed på somatisk amplikon-niveau

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analysert fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), indel	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	N/A (IKKE RELEVANT)	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	N/A (IKKE RELEVANT)	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	N/A (IKKE RELEVANT)	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	N/A (IKKE RELEVANT)	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	N/A (IKKE RELEVANT)	0,44	27575	0	28	99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	N/A (IKKE RELEVANT)	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), indel	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	N/A (IKKE RELEVANT)	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
69	11	47470345	47470444	100	100	N/A (IKKE RELEVANT)	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	N/A (IKKE RELEVANT)	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	N/A (IKKE RELEVANT)	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), indel	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	N/A (IKKE RELEVANT)	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	N/A (IKKE RELEVANT)	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	N/A (IKKE RELEVANT)	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	N/A (IKKE RELEVANT)	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	N/A (IKKE RELEVANT)	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	N/A (IKKE RELEVANT)	0,37	34386	0	12	>99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	N/A (IKKE RELEVANT)	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	N/A (IKKE RELEVANT)	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	N/A (IKKE RELEVANT)	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	N/A (IKKE RELEVANT)	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	N/A (IKKE RELEVANT)	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), indel	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), indel	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	N/A (IKKE RELEVANT)	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	N/A (IKKE RELEVANT)	0,6	37398	0	24	99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikon, Start	Amplikon, Slut	Analyseret fragmentstørrelse	Baser i pålidelige områder	Amplikonets genomindhold	GC-indhold	Korrekte bestemmelser	Ukorrekte bestemmelser	Manglende bestemmelser	% korrekte bestemmelser
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	N/A (IKKE RELEVANT)	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	N/A (IKKE RELEVANT)	0,55	0	0	0	N/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	N/A (IKKE RELEVANT)	0,48	0	0	0	N/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	N/A

Sekventeringsresultaterne for prøve GM12878 blev sammenlignet med en genotype med høj sikkerhed for NA12878, som er udviklet af National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). 92 ud af de 150 amplikoner var helt inden for genområderne med høj sikkerhed, 41 amplikoner havde delvis overlapning, og 17 amplikoner havde ingen overlapning i NIST-sekvensen. Dette resulterede i 10.000 koordinater pr. replikat til sammenligning. Basebestemmelser uden variationer blev sammenlignet med det humane referencegenom hg19. Resultaterne vedrørende nøjagtighed er vist i [Tabel 18](#).

Tabel 18 Somatisk overensstemmelse mellem prøve GM12878 og NIST-databasen

Sample (Prøve)	Antal amplikoner	Gennemsnitlig bestemmelsesrate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Baseret på dataene fra denne somatiske undersøgelse med ni kørsler, kan NextSeq 550Dx-instrumentet konsekvent sekventere:

- ▶ GC-indhold ≥ 19 % (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner med 19 % GC-indhold blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 2,6 %)
- ▶ GC-indhold ≥ 87 % (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner med 87 % GC-indhold blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,6 %)
- ▶ PolyA-længder ≤ 9 (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyA-gentagelse på ni nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 2,5 %)
- ▶ PolyT-længder ≤ 10 (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyT-gentagelse på ti nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,1 %)
- ▶ PolyG-længder ≤ 6 (alle bestemte baser i 2268 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyG-gentagelse på seks nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,5 %)
- ▶ PolyC-længder ≤ 6 (alle bestemte baser i 756 sekventerede amplikoner indeholdende en PolyC-gentagelse på seks nukleotider blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,4 %)
- ▶ Længder på dinukleotid-gentagelse $\leq 4x$ (alle bestemte baser i 1890 sekventerede amplikoner indeholdende en 4x dinukleotid-gentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,9 %)
- ▶ Længder på trinukleotid-gentagelse $\leq 5x$ (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner indeholdende en 5x trinukleotid-gentagelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 1,4 %)
- ▶ Længder på insertion ≤ 23 (alle bestemte baser i 378 sekventerede amplikoner indeholdende en 23 nukleotiders indsættelse blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,8 %)
- ▶ Længder på deletion ≤ 25 (alle bestemte baser i 1134 sekventerede amplikoner indeholdende en 25 nukleotiders deletion blev korrekt bestemt med en rate for manglende bestemmelse på 0,7 %)

Præcision

Præcisionen for NextSeq 550Dx-instrumentet blev bestemt ved at teste 13 unikke Platinum Genome-prøver ved hjælp af tre instrumenter, tre reagenspartier og tre operatører, der genererede ni sekventeringskørsler over fem startdage. Den repræsentative analyse, prøverne og referencemetoden er de samme som dem, der er beskrevet for nøjagtighedsstudiet for kimceller. Ydeevne for præcision blev bestemt ved varianskomponentanalyse ved hjælp af VAF som responsvariabel og beregning af standardafvigelser på komponentniveau for instrumentet, reagenspartiet, operatøren og startdagen ([Tabel 19](#)). Det samlede antal observationer, der blev anvendt i analysen for hver instrumentkomponent, operatør eller variabilitet for reagenspartiet var 699, 176 og 235 for henholdsvis SNV'er, insertioner og deletioner.

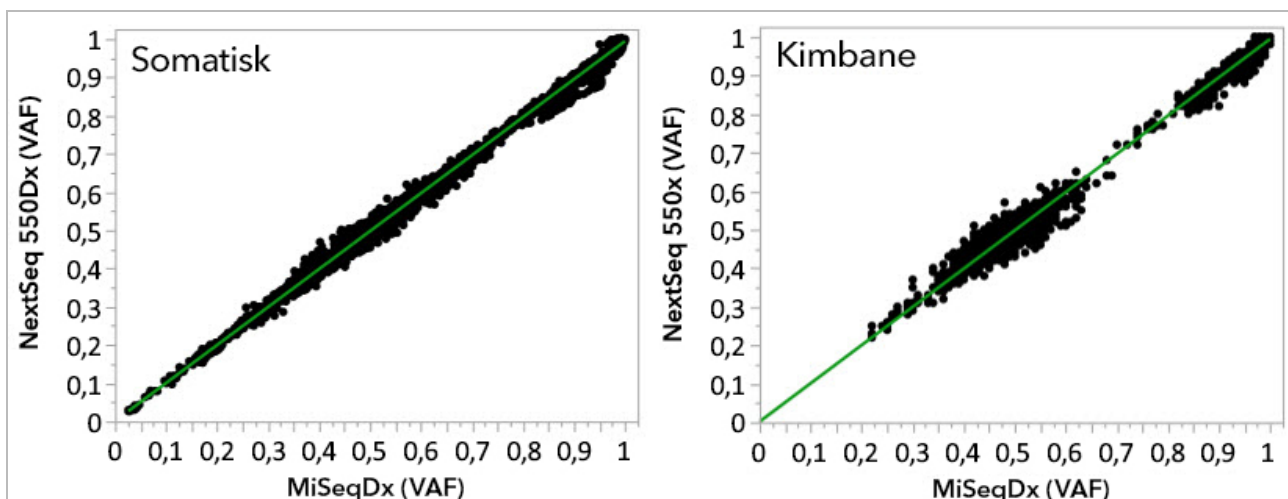
Tabel 19 Præcisionsresultater for NextSeq 550Dx-instrumentet (standardafvigelse)

Komponent	Variationstype	Standardafvigelse for komponent		Samlet standardafvigelse	
		Maks.	Median	Maks.	Median
Parti	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deletion	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertion	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deletion	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatør	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertion	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deletion	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dag	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertion	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deletion	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Metodesammenligning (sekventeringsplatform)

Helblods- og FFPE-prøver blev analyseret på NextSeq 550Dx-instrumentet og MiSeqDx-instrumentet ved brug af den kimcellebaserede arbejdsgang og den somatiske arbejdsgang med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Overensstemmelse mellem variationsfrekvens for blod- og FFPE-prøverne blev evalueret ved brug af flere repræsentative analyser. [Figur 2](#) illustrerer VAF-korrelationen mellem de to instrumenter for en repræsentativ analyse, og [Tabel 20](#) opsummerer denne korrelation efter analysepanel. Baseret på den stærke korrelation mellem MiSeqDx-instrumentet og NextSeq 550Dx-instrumentet er det blevet bestemt, at karakteristika for ydeevne relateret til præanalytiske faktorer (f.eks. ekstraktionsmetoder eller interfererende stoffer) gælder begge instrumenter. Se yderligere oplysninger i indlægssedlen til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Figur 2 VAF-korrelation for MiSeqDx- og NextSeq 550Dx-instrumenterne for prøver med FFPE (venstre) og blod (højre) ved brug af analyse 1



Tabel 20 Resultater af metodesammenligning ved brug af unikke blod- og FFPE-prøver

gDNA-kilde	Analyse (oligo-panel)	Biologiske replikater (prøver)	Tekniske replikater (pr. prøve)	Observationer (antal variationer)	Hældning	Skæringspunkt	Korrelation (R ²)
Blod	Analyse 1	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Blod	Analyse 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analyse 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Analyse 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹To datapunkter blev fjernet på baggrund af den angivne begrænsning for Germline Variant Module.

²Koefficient for bestemmelse af VAF-plot som illustreret i figur 2.

Reproducerbarhed

Reproducerbarheden med NextSeq 550Dx-instrumentet blev evalueret ved brug af Platinum Genome-prøver med en repræsentativ analyse, der er designet til at undersøge en række gener, der dækker 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer ved brug af 150 amplikoner. Kimcellestesten bestod af syv replikater af 13 prøver; den somatiske test bestod af seks replikater af syv prøver ved forskellige VAF-niveauer. Prøverne blev klargjort ved brug af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testen blev udført på tre eksterne centre ved brug af ét parti af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Der blev anvendt et enkelt NextSeq 550Dx-instrument på hvert center. To operatører på hvert center udførte testen. Hver operatør gennemførte testen på tre startdage, som ikke lå i direkte forlængelse af hinanden, for hver prøvetype, det vil sige 36 kørsler i alt på tværs af de tre centre. Dette resulterede i 18 kørsler med henholdsvis den kimcellerelaterede arbejdsgang og den somatiske arbejdsgang.

Kimcelle

Kimcellevariationer med et VAF-niveau på $\geq 0,2$ rapporteres som positive (variation). For forventede positive kimcellevariationer blev dataene evalueret med hensyn til rate for manglende bestemmelse og rate for korrekt positiv bestemmelse inden for hver variationstype (SNV, insertion, deletion). Tabel 21 opsummerer de observerede rater samt nedre og øvre 95 %-konfidensniveauer (LCL/UCL), der er beregnet med Wilson Score-metoden, for hver variationstype.

Tabel 21 Observationer vedrørende rapportering af kimceller for forventede positive resultater efter variationstype

Variationstype	Manglende bestemmelse			Korrekt positiv bestemmelse				
	Observeret	I alt	Procent	Observeret	I alt	Procent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Insertioner	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Deletioner	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Kimcellevariationer med et VAF-niveau $< 0,2$ rapporteres som negative (vildtype). For forventede negative kimcellelokationer blev dataene evalueret med hensyn til raterne for manglende bestemmelse og korrekt bestemmelse af vildtype. Tabel 22 opsummerer de observerede rater samt nedre og øvre 95 %-konfidensniveauer (LCL/UCL), der er beregnet med Wilson Score-metoden.

Tabel 22 Observationer vedrørende rapportering af kimceller for forventede negative resultater

Variationstype	Manglende bestemmelse			Korrekt negativ bestemmelse				
	Observeret	I alt	Procent	Observeret	I alt	Procent	95 % LCL	95 % UCL
Vildtype	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Kimcellevariationer med et VAF-niveau $\geq 0,2$ og $< 0,7$ rapporteres som positive heterozygoter for variationen, og variationer med et VAF-niveau $\geq 0,7$ rapporteres som positive homozygoter for variationen. Der blev anvendt kimcelleprøver med heterozygote variationer for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet påvirker genotypebestemmelse. Cx blev bestemt for begge skæringsværdier (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. For den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF var Cx $\geq 99,999$ %, hvilket indikerer, at $\geq 99,999$ % af heterozygote variationer bestemmes som heterozygote. For den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF, var Cx $\leq 0,001$ %, hvilket indikerer, at $\geq 0,001$ % af de heterozygote variationer bestemmes som homozygote. **Tabel 23** opsummerer resultaterne efter variationstype.

Kimcellevariationer med et VAF-niveau $\geq 0,2$ og $< 0,7$ rapporteres som positive heterozygoter for variationen, og variationer med et VAF-niveau $\geq 0,7$ bestemmes som positive homozygoter for variationen. Der blev anvendt kimcelleprøver med heterozygote variationer for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet påvirker genotypebestemmelse. Cx blev bestemt for begge skæringsværdier (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. For den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF, var Cx $\geq 99,999$ %, hvilket indikerer, at $\geq 99,999$ % af de heterozygote variationer bestemmes som heterozygote. For den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF, var Cx $\leq 0,001$ %, hvilket indikerer, at $\geq 0,001$ % af de heterozygote variationer bestemmes som homozygote. **Tabel 23** opsummerer resultaterne efter variationstype.

Tabel 23 Cx-værdier for kimceller for heterozygote variationer

Variationstype	Skæringsværdi på 0,2 VAF	Skæringsværdi på 0,7 VAF
	$\geq 99,999$ %	$\leq 0,001$ %
SNV	94/94	94/94
Insertioner	24/24	24/24
Deletioner	35/35	35/35
I alt	153	153

Somatisk

Somatiske variationer med et VAF-niveau $\geq 0,026$ rapporteres som positive (variation). Observationer med VAF-niveauer $\geq 0,01$ og $< 0,026$ blev betragtet som tvetydige (hverken positive eller negative, markeret som lav variationsfrekvens). Resultaterne blev beregnet på tre måder for at vurdere ydeevnen:

- ▶ Bedste tilfælde: Tvetydige resultater blev betragtet som korrekte positive bestemmelser (overensstemmelse med de forventede resultater)
- ▶ Værste tilfælde: Tvetydige resultater blev betragtet som ukorrekte bestemmelser (uoverensstemmelse med de forventede resultater)
- ▶ Eksklusionstilfælde: Tvetydige resultater blev udelukket fra analysen

Resultaterne for bestemmelse for henholdsvis bedste tilfælde, værste tilfælde og eksklusionstilfælde samt nedre og øvre 95 %-konfidensinterval (LCL/UCL) beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden er opsummeret i tre tabeller, **Tabel 24**, **Tabel 25** og **Tabel 26**.

Tabel 24 Observationer vedrørende somatisk bestemmelse for forventede positive resultater efter variationstype (bedste tilfælde)

Variationstype	Korrekt positiv bestemmelse				
	Observeret	I alt	Procent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertioner	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Deletioner	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabel 25 Observationer vedrørende somatisk bestemmelse for forventede positive resultater efter variationstype (værste tilfælde)

Variationstype	Korrekt positiv bestemmelse				
	Observeret	I alt	Procent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertioner	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Deletioner	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabel 26 Observationer vedrørende somatisk bestemmelse for forventede positive resultater efter variationstype (tvetydige rapporteringer fjernet)

Variationstype	Korrekt positiv bestemmelse				
	Observeret	I alt	Procent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertioner	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Deletioner	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Somatiske variationer med et VAF-niveau $<0,01$ bestemmes som negative (vildtype). For forventede negative somatiske lokationer blev dataene evalueret med hensyn til raten for manglende bestemmelse og raten for korrekt bestemmelse af vildtype. Korrekte vildtypebestemmelser blev bestemt, ved at udelukke manglende bestemmelser, og fratække de observerede bestemmelser, der lå i den tvetydige zone (VAF-niveauer $\geq 0,01$ og $<0,026$), samt de ukorrekte bestemmelser, der var over skæringsværdien (VAF-niveauer $\geq 0,026$) fra totalen. **Tabel 27** opsummerer de observerede, totale og procentvise resultater for negative somatiske placeringer, hvad angår rater for manglende bestemmelse og korrekt bestemmelse af vildtype samt nedre og øvre 95 %-konfidensniveauer (LCL/UCL) beregnet med Wilson Score-metoden.

Tabel 27 Observationer vedrørende somatisk bestemmelse for forventede negative resultater

Variations- type	Manglende bestem- melse			Korrekt bestem- melse						
	Observeret	I alt	Pro- cent	Tvetydige	Ukorrek- te	Korrekte	I alt	Pro- cent	95 % LCL	95 % UCL
Vildtype	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Somatiske prøver ved forskellige VAF-niveauer for samme variation blev evalueret, for at bestemme C95 af analysen (inden for hver variationstype). For at evaluere variabiliteten nær analysens skæringsværdi, blev der anvendt prøver med forventede VAF-niveauer mellem 0,02 og 0,07. C95 blev bestemt for hver variation, og det højeste C95 for hver variationstype er angivet i **Tabel 28**.

Tabel 28 Oversigt over somatisk C95

Variationstype	N	C95
SNV	74	0,0613
Insertion	24	0,0573
Deletion	33	0,0575

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycle) Ydeevne

Oversigt

NextSeq 550Dx understøttes af to reagenskits: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). For at påvise, at NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) er i stand til at overholde de krav til ydeevne, der er verificeret og valideret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), blev studier udført med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Der blev klargjort to biblioteker ved hjælp af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, ét med den kimcellebaserede arbejdsgang og ét andet med den somatiske arbejdsgang. Biblioteker fra hver arbejdsgang blev testet med tre partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) på tre NextSeq 550Dx-instrumenter. Derudover inkluderede testen for hver arbejdsgang en enkelt kørsel med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Analysefølsomhed (blindgrænse [LoB] og detektionsgrænse [LoD])

Verificering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) påviste, at NextSeq 550Dx-instrumentet kan detektere variationer på 0,05 VAF med en Type II-fejl $\leq 0,05$, og at skæringsværdien på 0,026 VAF, der anvendes af Somatic Variant Module (effektiv LoB), understøtter en Type I-fejl $\leq 0,01$. Baseret på disse påstande forventes det, at en variation på 0,05 VAF er større end eller lig med 0,026 VAF i 95 % af tiden, og at en vildtypeposition er mindre end 0,026 VAF i 99 % af tiden. For at sikre at disse påstande blev opfyldt af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) blev der foretaget gentagne målinger på NextSeq 550Dx-instrumentet med vildtypeprøverne (LoB-prøver) og med prøver, der indeholder variationer på 0,05 VAF (LoD-prøver), ved hjælp af NextSeq 550 Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Andelen af bestemmelser over og under skæringsværdien på 0,026 blev herefter sammenlignet med de påstande, der blev etableret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Testen inkluderede to LoD-prøver med et unikt sæt af variationer målrettet mod 0,05 VAF og tilsvarende LoB-prøver, der var vildtype for målrettede variationer. Til klargøring af bibliotek blev LoD- og LoB-prøver behandlet i replikater på henholdsvis otte og syv ved hjælp af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteker blev i første omgang sekventeret ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) for at identificere variationer/genomiske koordinater til evaluering af LoB/LoD med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Alle variationer med en gennemsnitlig VAF mellem 0,045-0,055 (LoD-variationer) baseret på resultaterne fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) blev anvendt til LoD-analyse (N = 51 variationer). Til LoB-analyse blev de 51 tilsvarende genomiske koordinater vurderet.

Til evaluering af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) blev biblioteker sekventeret i tre kørsler over tre på hinanden følgende dage ved hjælp af det samme instrument og det samme parti reagenskit. Denne test udgjorde 24 replikater for hver af de 51 LoD-variationer og 21 replikater for hver af de tilsvarende vildtypepositioner. Andelen af bestemmelse af vildtyper med VAF $< 0,026$ er angivet i [Tabel 29](#). Andelen af bestemmelse af LoD-variationer VAF, der er større end eller lig med 0,026 er angivet i [Tabel 30](#).

Tabel 29 Andelen af bestemmelser $< 0,026$ for vildtypepositioner (evaluering af LoB-påstande)

Variationstype	Evaluerede positioner	Observationer i alt	Antal VAF-målinger $\geq 2,6$ %	Andel $< 2,6$ %	Andel 95 % konfidensinterval
SNV	32	672	0	1	0,994-1
Insertion	11	231	0	1	0,984-1
Deletion	8	168	0	1	0,978-1

Tabel 30 Andel af bestemmelser $\geq 0,026$ VAF for LoD-varianter (evaluering af LoD-påstande)

Variationstype	Evaluerede positioner	Observationer i alt	Antal VAF-målinger < 2,6 %	Antal VAF-målinger $\geq 2,6$ %	Andel $\geq 2,6$ %	Andel 95 % konfidensinterval
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993-1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967-0,996
Deletion	8	192	2	190	0,99	0,963-0,997

Nøjagtighed

Kimcelle

Følgende studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af variationsbestemmelse med Germline Variant Module ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). 12 unikke Platinum Genome-prøver blev testet ved hjælp af en repræsentativ analyse. Der blev i alt foretaget 11 kørsler ved hjælp af tre NextSeq 550Dx-instrumenter og tre NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Nøjagtigheden blev bestemt for SNV'er, insertioner og deletioner ved at sammenligne resultaterne med en velkarakteriseret sammensat referencemetode, Platinum Genomes version 2016-1.0. Resultater vedrørende nøjagtighed fra en enkelt sekventeringskørsel med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) er angivet som reference. En oversigt over resultaterne er vist i [Tabel 31](#).

Tabel 31 Oversigt over kimcelleoverensstemmelse

Kriterier	Observationer i alt (v2.5) ¹	Resultat efter observation (v2.5) ²	Resultat efter observation (v2) ³	Resultat efter kørsel (v2.5) ⁴	Resultat efter kørsel (v2) ⁴
PPA for SNV	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA for insertioner	1056	100	100	100	98,9
PPA for deletioner	1056	95,2	95,2	>99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Beregnet som antallet af prøver pr. kørsel x antallet af kørsler (96 prøver pr. kørsel x 11 kørsler = 1056 observationer).

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle kørsler (baseret på 11 kørsler for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af én kørsel (i alt 96 observationer).

⁴Laveste værdi, når data fra hver kørsel analyseres samlet.

Somatisk

Følgende studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af bestemmelse af variationer med Somatic Variant Module på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Ti Platinum Genome FFPE-prøver (to med variationer fortyndet ned til 0,05 VAF) blev testet ved hjælp af en repræsentativ analyse. Der blev i alt foretaget 11 kørsler ved hjælp af tre NextSeq 550Dx-instrumenter og tre partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Nøjagtigheden blev bestemt for SNV'er, insertioner og deletioner ved at sammenligne resultaterne med en velkarakteriseret sammensat referencemetode, Platinum Genomes version 2016-1.0. Resultater vedrørende nøjagtighed fra en enkelt sekventeringskørsel med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) er angivet som reference. En oversigt over resultaterne er vist i [Tabel 32](#).

Tabel 32 Oversigt over somatisk overensstemmelse

Kriterier	Observationer i alt (v2.5) ¹	Resultat efter observation (v2.5) ²	Resultat efter observation (v2) ³	Resultat efter kørsel (v2.5) ⁴	Resultat efter kørsel (v2) ⁴
PPA for SNV	528	100	100	100	100
PPA for insertioner	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9
PPA for deletioner	528	100	100	100	100
NPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
OPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Beregnet som antallet af prøver pr. kørsel x antallet af kørsler (48 prøver pr. kørsel x 11 kørsler = 528 observationer).

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle kørsler (baseret på 11 kørsler for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af én kørsel (i alt 96 observationer).

⁴Laveste værdi, når data fra hver kørsel analyseres samlet.

Præcision

Kimcelle

Præcisionen for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) med Germline Variant Module blev evalueret ved hjælp af Platinum Genome-prøver og en repræsentativ analyse. Testen bestod af et enkelt bibliotek klargjort ved hjælp af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og omfattede 12 prøver behandlet med otte replikater hver. Biblioteker blev sekventeret med tre partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter i ni sekventeringskørsler i alt.

Der blev anvendt prøver med heterozygote variationer for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet ville påvirke genotypebestemmelsen (N = 153 unikke heterozygote variationer). Cx blev bestemt for begge skæringsværdier for Germline Variant Module (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. For den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF var variationen med den mindste Cx for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) >99,9 %, hvilket indikerer, at >99,9 % af heterozygote variationer bestemmes som heterozygote. For den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF var variationen med den maksimale Cx for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) <1,5 %, hvilket indikerer, at ≤1,5 % af heterozygote variationer bestemmes som homozygote. Tabel 33 opsummerer resultaterne efter variationstype. Cx-værdier fra den enkelte sekventeringskørsel ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) er angivet som reference.

Tabel 33 Cx-værdier for kimceller for heterozygote variationer

Variationstype	N	Skæringsværdi på 0,2 VAF		Skæringsværdi på 0,7 VAF	
		Cx-min. (v2.5) ¹	Min. Cx (v2) ²	Maks. Cx (v2.5) ¹	Maks. Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Insertioner	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Deletioner	35	100 %	>99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

¹Cx-værdier baseret på estimer af total standardafvigelse fra varianskomponentanalyse.

²Cx-værdier baseret på standardafvigelse for prøven.

Somatisk

Præcisionen for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) med Somatic Variant Module blev evalueret ved hjælp af Platinum Genome FFPE-prøver og en repræsentativ analyse. Testen bestod af et enkelt bibliotek klargjort ved hjælp af TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og omfattede to prøver med otte replikater hver. Biblioteker blev sekventeret ved hjælp af tre partier af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter i ni sekventeringskørsler i alt.

Somatiske variationer med forventede VAF-niveauer $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unikke variationer) blev anvendt til at evaluere instrumentvariabilitet nær skæringsværdien for VAF i Somatic Variant Module (somatiske variationer med VAF-niveau $\geq 0,026$ bestemmes som positive for variationen). C95-værdier blev bestemt for hver af de somatiske variationer. C95-værdier repræsenterer den VAF, ved hvilken der er størst sandsynlighed for, at værdierne for skæringsværdien for VAF for Somatic Variant Module er 95 %. De højeste C95-værdier efter variationstype er rapporteret i [Tabel 34](#). C95-resultater fra en enkelt sekventeringskørsel ved hjælp af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) er angivet som reference.

Tabel 34 Oversigt over somatisk C95

Variationstype	Antal evaluerede variationer	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insertioner	24	0,062	0,061
Deletioner	33	0,060	0,060

¹C95-værdier baseret på estimer af total standardafvigelse fra variationskomponentanalyse.

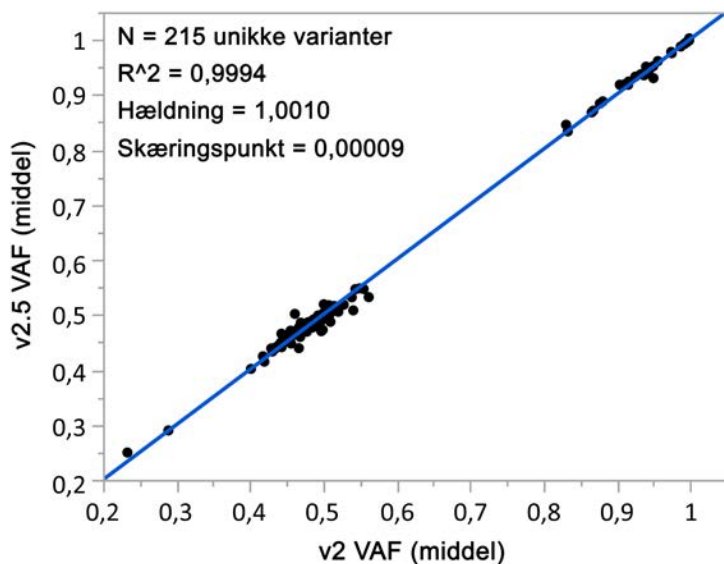
²C95-værdier baseret på standardafvigelse for prøven.

Metodesammenligning (reagenskit)

Kimcelle

De gennemsnitlige VAF'er fra 215 unikke variationer blev evalueret på tværs af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) ved hjælp af resultater genereret fra Germline Variant Module. VAF-gennemsnit blev beregnet fra 11 sekventeringskørsler (v2.5) og én sekventeringskørsel (v2). Der blev anvendt mindst otte replikater til at beregne gennemsnittet for hver variation. I [Figur 3](#) er VAF-korrelationen mellem de to reagenskits indtegnet. Baseret på den stærke lineære VAF-korrelation og ligheden i resultaterne mellem reagenskits blev det besluttet, at karakteristika for ydeevne, der i første omgang var verificeret og valideret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) med Germline Variant Module, gælder for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

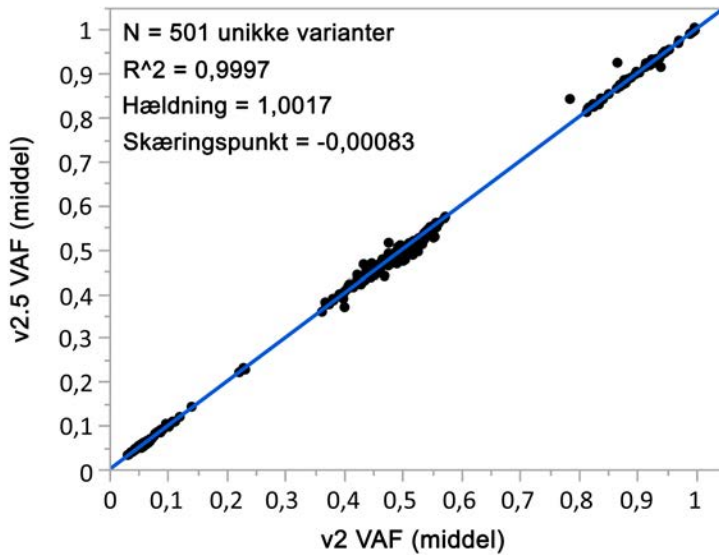
Figur 3 VAF-korrelation for Germline Variant Module NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Somatisk

De gennemsnitlige VAF'er fra 501 unikke variationer blev evalueret på tværs af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) ved hjælp af resultater genereret fra Somatic Variant Module. VAF-gennemsnit blev beregnet fra 11 sekventeringskørsler (v2.5) og én sekventeringskørsel (v2). Der blev anvendt mindst tre replikater til at beregne gennemsnittet for hver unikke variation. I [Figur 4](#) er VAF-korrelationen mellem de to reagenskits indtegnet. Baseret på VAF-korrelationen og ligheden i resultaterne mellem reagenskits blev det besluttet, at karakteristika for ydeevne, der var verificeret og valideret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) med Somatic Variant Module, gælder for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figur 4 VAF-korrelation for Somatic Variant Module mellem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Revisionshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 100000030326 v06	Maj 2022	Opdateringer for at rette indhold, der uforsætligt var tilføjet fra kildesoftware.
Dokumentnr. 100000030326 v05	November 2021	Tilføjede erklæring om advarsler og forsigtighedsregler i forhold til rapportering af alvorlige hændelser. Tilføjede en erklæring om procedureprincipper med specifikation af den tilsigtede bruger. Fjernede henvisning til High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Tilføjede henvisning til High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles).
Dokumentnr. 100000030326 v04	August 2021	Tilføjelse af revisionshistorik. Opdaterede adresse for EU-godkendt repræsentant.

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

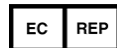
© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australsk sponsor

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

Produktmærkning

Du finder en fyldestgørende forklaring til de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen til det pågældende kit på support.illumina.com.