

# NextSeq™ 550Dx-instrument

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

KUN FOR EKSPORT

Katalognr. 20005715

## Tiltenkt bruk

NextSeq 550Dx-instrumentet er beregnet for sekvensering av DNA-biblioteker når det brukes sammen med *in vitro*-diagnostiske analyser. NextSeq 550Dx-instrumentet skal brukes med spesifikt registrerte, sertifiserte eller godkjente *in vitro*-diagnostiske reagenser og analyseprogramvare.

## Prosedyreprinsipper

Illumina NextSeq 550Dx-instrumentet er beregnet for sekvensering av DNA-biblioteker med *in vitro*-diagnostiske analyser og er beregnet for bruk av kvalifisert og opplært klinisk laboratoriepersonell med opplæring i bruk av prosedyrer for *in vitro*-diagnostikk i et klinisk laboratorium. For inndata bruker NextSeq 550Dx biblioteker generert fra DNA der prøveindekser og innfangingssekvenser blir lagt til amplifiserte mål. Prøvebiblioteker blir innfanget på en strømningscelle og sekvensert på instrumentet ved hjelp av sekvensering ved syntesekjemi (SBS). SBS-kjemi bruker en reversibel terminator metode for å detektere fluorescensmerkede, enkle nukleotidbaser idet de blir inkorporert i voksende DNA-strenger. Programvaren for sanntidsanalyse (Real-Time Analysis – RTA) utfører bildeanalyser og basebetegnelse, og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringscyklus. Når primæranalysen er ferdig, kan sekundæranalysen utføres på instrumentet for å behandle basebetegnelser. NextSeq 550Dx bruker forskjellige sekundæranalysemoduler avhengig av arbeidsflyten. For Germline eller Somatic Variant-modulene omfatter behandling demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og generering av variantbetegnelsesformat (VCF og gVCF)-filer. VCF- og gVCF-filene inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom.

## Dobbeltoppstart-konfigurasjon

NextSeq 550Dx inkluderer en dobbeltoppstart-konfigurasjon for å aktivere bruken av instrumentet i enten diagnostisk modus (Dx) eller kun til bruk i forskningsmodus (RUO). *In vitro*-diagnostiske sekvenseringsanalyser, inkludert Germline- og Somatic Variant-modulene, utføres i diagnostisk modus. Bare IVD-sekvenseringsreagenser kan brukes i diagnostisk modus. Ytelseskarakteristikker og begrensninger av prosedyren for NextSeq 550Dx-instrumentet har blitt etablert ved bruk av Germline og Somatic Variant-modulene i diagnostisk modus.

## Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- 2 Når de brukes med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser), er Germline og Somatic Variant-modulene i stand til å levere:
  - ▶ Utdata for sekvensering  $\geq 90$  Gb
  - ▶ Avlesningslengde (i paired-end-kjøring) 2 x 150 basepar (bp)
  - ▶ Baser tilsvarende eller mer enn Q30  $\geq 75$  % ved avlesningslengde på 2 x 150 bp  
Tilsvarende eller mer enn 75 % av baser har kvalitetsscorer på Phred-skalaen  $\geq 30$ , som indikerer nøyaktighet av basebetegnelse større enn 99,9 %

- 3 Avlesninger med indeler (innsettinger, slettinger eller kombinasjoner) der innholdslengden er > 25 basepar (bp), blir ikke innrettet av analyseprogrammet. Derfor kan indeler med en lengde på > 25 bp ikke påvises av analyseprogrammet.
- 4 Analyseprogrammet innretter kanskje ikke PCR-produktavlesninger med ekstremt variantinnhold, noe som resulterer i at regionen blir rapportert som villtype. Slikt ekstremt innhold omfatter:
  - ▶ Avlesninger som inneholder mer enn tre indeler
  - ▶ Avlesninger med lengde på minst 30 bp med enkel nukleotidvariant (SNV)-innhold på > 4 % av den totale PCR-produktmållengden (unntatt probeområder)
  - ▶ Avlesninger med lengde på < 30 bp med SNV-innhold på > 10 % av den totale amplikonlengden (inkludert probeområder)
- 5 Store varianter, deriblant multinukleotidvarianter (MNV-er) og store indeler, kan rapporteres som separate mindre varianter i utdata-VCF-filen.
- 6 Delesjonsvarianter kan filtreres eller utelates når de spenner over to sidestilte PCR-produkter, dersom delesjonslengden er større enn eller lik overlappingen mellom de sidestilte PCR-produktene.
- 7 Systemet kan ikke påvise indeler hvis de oppstår rett ved siden av en primer og det ikke er noe overlappende PCR-produkt. For områder med overlappende PCR-produkter kan ikke analysen påvise slettinger når overlappingsområdet er mindre enn størrelsen på slettingen som skal påvises. Hvis for eksempel overlappingsområdet mellom to tilstøtende PCR-produkter er to baser, kan analysen ikke påvise delesjoner som inkluderer begge disse basene. En enkelt basesletting på én av disse basene kan påvises.
- 8 Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser for bibliotekklargjøring kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsettinger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes og betegnelsene som utføres under sekvensering. Eksempel:
  - ▶ En variant i fase med en variant i primerregionen kan ikke forsterkes, noe som resulterer i en falsk negativ.
  - ▶ Varianter i primerområdet kan forhindre forsterkningen av referanseallelen, noe som resulterer i feil homozygot variantbetegnelse.
  - ▶ Indelvarianter i primerområdet kan forårsake en falskt positiv betegnelse på slutten av avlesningen ved siden av primeren.
- 9 Indeler kan filtreres på grunn av strengeavvik hvis de forekommer nær enden av en avlesning og blir «soft-clipped» under innretting.
- 10 Små MNV-er har ikke blitt validert og rapporteres kun i Somatic Variant-modulen.
- 11 Slettinger rapporteres i VCF ved koordinaten til den foregående basen etter VCF-format. Derfor skal det vurderes tilstøtende varianter før rapportering om at en individuell basebetegnelse er en homozygot referanse.
- 12 Kimbanespesifikke begrensninger:
  - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet som bruker Local Run Manager Germline-variantmodulen for NextSeq 550Dx, er utviklet for å levere kvalitative resultater for germline-variantbetegnelser (f.eks. homozygot, heterozygot, villtype).
  - ▶ Ved bruk med Germline Variant-modulen er minimum dekning per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 150x. Dermed kreves 150 støttende DNA-fragmenter, noe som tilsvarer 300 overlappende paired-end-avlesninger. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
  - ▶ Variasjon i kopinummer kan påvirke om en variant identifiseres som homozygot eller heterozygot.
  - ▶ Varianter i en viss gjentakende kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegnetomet ved siden av variantposisjonen. For kimbanevariantbetegnelse kreves det minst ni repetisjoner i referansen for at en variant skal filtreres. Kun repetisjoner med en lengde på opptil 5 bp vurderes (R5x9).
  - ▶ En indel og en SNV på et enkelt locus kan resultere i at bare én variant blir rapportert.

### 13 Somatisk spesifikke begrensninger.

- ▶ NextSeq 550Dx-systemet som bruker Local Run Manager Somatic Variant-modul for NextSeq 550Dx, er designet for å levere kvalitative resultater for somatisk variantbetegnelse (f.eks. tilstedeværelse av en somatisk variant med en variantfrekvens større enn eller lik 0,026 med en deteksjonsgrense på 0,05).
- ▶ Ved bruk med Somatic Variant-modulen er minimum dekning per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 450x per oligonukleotidsammenslåing. Dermed kreves 450 støttende DNA-fragmenter per oligonukleotidsammenslåing, noe som tilsvarer 900 overlappende paired-end-avlesinger. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
- ▶ For en somatisk variantbetegnelse er det nødvendig med minst seks repetisjoner i referansen for at varianten skal filtreres, og bare repetisjoner med en lengde på opptil 3 bp vurderes (R3x6).
- ▶ Somatic Variant-modulen kan ikke skille mellom kimlinjevarianter og somatiske varianter. Modulen er utformet for å påvise varianter over en rekke variantfrekvenser, men variantfrekvens kan ikke brukes til å skille mellom somatiske varianter og kimlinjevarianter.
- ▶ Normalt vev i prøven påvirker påvisningen av varianter. Den rapporterte påvisningsgrensen er basert på en variantfrekvens i forhold til det totale DNA-et som ekstraheres fra både tumor og normalt vev.

## Produktkomponenter

- 1 NextSeq 550Dx-instrument (katalognr. 20005715)
- 2 Programvarekomponenter for NextSeq 550Dx-instrumentet inkluderer følgende:

Programvareapplikasjon	Funksjon	Beskrivelse
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Styrer bruk av instrumentet	NOS-programvareapplikasjonen administrerer bruk av instrumentet under sekvensering og genererer bilder for bruk av Real-Time Analysis-programvaren (RTA).
Real-time Analysis-programvare (RTA)	Utfører primæranalyse	RTA-programvareapplikasjonen konverterer bildene som genereres av NOS for hver flis per syklus av sekvenseringskjøringen til basebetegnelsesfiler, som er inndata for analysemodulene i Local Run Manager. RTA-programvareapplikasjonen inneholder ikke et brukergrensesnitt.
Local Run Manager	Grensesnitt for modulvalg	Local Run Manager-programvaren er en integrert løsning på instrument for brukeradministrering, valg av egnet analysemodul og overvåking av status.
Somatic Variant Module	Utfører sekundæranalyse	Denne Local Run Manager-analysemodulprogramvaren behandler basebetegnelser gjennom sekundæranalyse. Behandlingen omfatter demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og rapportering. Variantbetegneren (Pisces) genererer VCF-filer som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom og omfatter den målte variantfrekvensen.
Germline Variant Module	Utfører sekundæranalyse	Denne Local Run Manager-analysemodulprogramvaren behandler basebetegnelser gjennom sekundæranalyse. Behandlingen omfatter demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting, variantbetegnelse og rapportering. Variantbetegneren (Pisces) genererer VCF-filer som inneholder informasjon om varianter funnet ved spesifikke posisjoner i et referansegenom og identifiserer hver variant som heterozygot eller homozygot.

## Driftsbetingelser

Element	Spesifikasjon
Temperatur	Oppretthold en laboratorietemperatur på 19 °C til 25 °C (22 °C ±3 °C). Denne temperaturen er instrumentets driftstemperatur. Omgivelsestemperaturen må ikke få variere mer enn ±2 °C under en kjøring.
Luftfuktighet	Oppretthold en ikke-kondenserende relativ luftfuktighet på 20–80 %.

## Utstyr og materiell

### Nødvendig utstyr og materialer selges separat

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

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

### Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

#### Forbruksmateriell skaffet av brukeren for sekvenseringskjøringer

Forbruksmateriell	Leverandør	Formål
Spritservietter, 70 % isopropylalkohol eller etanol, 70 %	VWR, katalognr. 95041-714 (eller tilsvarende) Generell laboratorieleverandør	Rengjøring av strømningscelle og generell bruk
Laboratorieklut, lavt loinnhold	VWR, katalognr. 21905-026 (eller tilsvarende)	Rengjøring av strømningscelle og generell bruk

#### Forbruksmateriell skaffet av brukeren for instrumentvedlikehold

Forbruksmateriell	Leverandør	Formål
NaOCl, 5 % (natriumhypokloritt)	Sigma-Aldrich, katalognr. 239305 (eller tilsvarende laboratorie kvalitet)	Vask av instrumentet ved bruk av manuell vask etter kjøring; fortynnet til 0,12 %.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalognr. P7949	Vask av instrumentet ved bruk av alternativer for manuell vask; fortynnet til 0,05 %.
Vann, laboratorie kvalitet	Generell laboratorieleverandør	Vask av instrumentet (manuell vask)
Luftfilter	Illumina, katalognr. 20022240	Rengjøring av luften instrumentet trekker inn for avkjøling

#### Retningslinjer for vann av laboratorie kvalitet

Det må alltid brukes vann av laboratorie kvalitet eller deionisert vann for å utføre instrumentprosedyrer. Aldri bruk vann fra springen. Bruk kun vann av følgende kvalitet eller tilsvarende:

- ▶ Deionisert vann
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18 Megohm (MΩ) vann
- ▶ Milli-Q-vann
- ▶ Super-Q-vann
- ▶ Vann til molekylærbiologi

## Advarsler og forholdsregler

**FORSIKTIG** Føderal lov begrenser denne enheten til salg av, eller på bestilling av, en lege eller annet fagpersonell, lovmessig lisensiert i staten vedkommende praktiserer, for å bruke eller pålegge bruk av enheten.

- Noen komponenter for reagenser levert av Illumina for bruk med NextSeq 550Dx-instrumentet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter.** Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se sikkerhetsdatabladene (SDS) på [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
- Alvorlige uønskede hendelser knyttet til dette produktet skal umiddelbart rapporteres til Illumina og aktuelle myndigheter i landet der brukeren og pasienten befinner seg.
- Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare med humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universelle forholdsregler).
- Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- Riktig laboratoriepraksis og god laboratoriehygiene er nødvendig for å forhindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr og materiell (f.eks. dråpetellere, dråpetellerspisser, varmeblokker, vortekser og sentrifuger).
- Indeks for prøvesammenkobling må være i nøyaktig samsvar med trykt plateoppsett. Local Run Manager fyller automatisk ut indekssprimere som er tilknyttet prøvenavnene, når de er angitt i modulen. Brukeren anbefales å verifisere indekssprimere som er tilknyttet prøvene før sekvenseringskjøringen startes. Misforhold mellom prøven og plateoppsettet resulterer i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- Installasjon av brukerlevert antivirusprogramvare anbefales sterkt for å beskytte datamaskinen mot virus. Se brukerhåndboken for instruksjoner for installasjon.
- Ikke betjen NextSeq 550Dx hvis noen av panelene er fjernet. Bruk av instrumentet hvis ett eller flere paneler er fjernet, utgjør en potensiell risiko for eksponering overfor linjespenning og likestrømspenning.
- Ikke berør strømningscellestadiumet i strømningscellekammeret. Varmeenheten i dette kammeret fungerer mellom 22 °C og 95 °C, og kan forårsake brannskade.
- Instrumentet veier cirka 84 kg og kan forårsake alvorlig skade hvis det faller ned eller behandles på feil måte.

## Bruksanvisning

Følgende bruksanvisning er for å kjøre Germline og Somatic Variant-modulene i diagnostisk modus på NextSeq 550Dx-instrumentet ved bruk av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

## Angi kjøringsinformasjon

Du finner detaljerte instruksjoner i Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513) og egnet Local Run Manager-modulveiledning.

### Angi parametere

- Logg på Local Run Manager.

- 2 Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg **Somatic Variant** (Somatisk variant) eller **Germline Variant** (Kimbanevariant).
- 3 Skriv inn et kjøringens navn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse.  
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker.
- 4 **[Valgfritt]** Angi en kjøringens beskrivelse som gjør det lettere å identifisere kjøringen.  
Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understrekingstegn eller bindestreker.
- 5 Velg antall prøver og indekssett fra rullegardinlisten.  
Ta hensyn til følgende informasjon når du gjør et valg.
  - ▶ Rullegardinlisten inneholder antall prøver med et indekssett. For eksempel indikerer «24-Set 1» at 24 prøver skal testes, med indekser fra indekssett 1.
  - ▶ Indekssettnumre refererer til ulike sett med i5- og i7-indekspar. Sett 1 og sett 2 gir begge indeksdiversitet. To indekssett tilbys for å forhindre uttømming av et enkelt sett.
  - ▶ Velg antallet prøver som er nærmest det antallet prøver du tester. Hvis det nøyaktige antallet prøver ikke er i listen, velg det nærmeste antallet, men mindre enn antallet du tester. Hvis du for eksempel vil teste 18 prøver, velg 16 prøver.
  - ▶ Foreslåtte prøvebrønner og indekskombinasjoner som oppfyller indeks mangfoldkrav, fremheves med grønt.

#### Importere manifestfiler for kjøringen

- 1 Kontroller at manifestene du vil importere, er tilgjengelige på en tilgjengelig nettverksplassing eller på en USB-stasjon.
- 2 Velg **Import Manifests** (Importer manifeste).
- 3 Naviger til manifestfilen og velg de manifestene du vil legge til.

**MERK** For å gjøre manifestfiler tilgjengelige for alle kjøring ved hjelp av Germline Variant- eller Somatic Variant-analysemodulen legger du til manifestene ved hjelp av modulinnstillingsfunksjonen. Denne funksjonen krever tillatelser for bruker med administratorrettigheter. Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.


#### Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å bruke ett av alternativene og følgende instruksjoner.


- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstem fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

#### Legge inn prøver manuelt

- 1 Angi et unikt prøvenavn (**Somatic Variant-analysemodul**) eller prøve-ID (**Germline Variant-analysemodul**).  
Bruk alfanumeriske tegn, tankestreker eller understrekingstegn.
- 2 **[Valgfritt]** For positive eller negative kontrollprøver høyreklikker du og velger kontrolltypen.  
Kontrollen i én prøvebrønn fylles automatisk ut i tilsvarende brønn i den andre sammenslåingen med den samme kontrollen.
- 3 **[Valgfritt]** Angi en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse).  
Bruk alfanumeriske tegn, tankestreker eller understrekingstegn.
- 4 Velg en Indeks 1-adapter fra rullegardinlisten Index 1 (Indeks 1) (i7).  
Når du bruke foreslåtte prøvebrønner, fyller programvaren automatisk ut indeksadaptere i7 og i5 som oppfyller krav til indeks mangfold. Hvis det nøyaktige antallet prøver du tester, ikke er på listen, må du velge indeksadaptere for ekstra brønner.
- 5 Velg en Indeks 2-adapter fra rullegardinlisten Index 2 (Indeks 2) (i5).
- 6 Velg en manifestfil fra rullegardinlisten Manifest.  
Prøver i sammenslåing A krever et annet manifest enn prøver i sammenslåing B.

- 7 Velg et alternativ for å vise, skrive ut eller lagre plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker:
  - Velg ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet. Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet.
  - Velg **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 8 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

#### Importere prøver

- 1 Velg **Import Samples** (Importer prøver), og bla til plasseringen av prøveinformasjonsfilen. Det finnes to typer filer du kan importere.
  - Velg **Template** (Mal) på skjembildet Create Run (Opprett kjøring) for å lage en ny platelayout. Malfilen inneholder korrekte kolonneoverskrifter for import. Angi prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. Slett eksempelinformasjon i ubrukte celler, og lagre deretter filen.
  - Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra Gemline Variant- eller Somatic Variant-modulen med funksjonen Export (Eksporter).
- 2 Velg ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.
- 3 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 4 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

## Klargjøre reagenskassetten

Følg retningslinjene for reagenskassetter nøye for vellykket sekvensering.

- 1 Ta reagenskassetten ut fra oppbevaring på  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Velg en av følgende fremgangsmåter for å tine reagensene. Ikke senk kassetten ned i væske. Når kassetten er tint, må den tørkes før du går videre til neste trinn.

Temperatur	Tinetid	Stabilitetsgrense
15 °C til 30 °C vannbad	60 minutter	Skal ikke overskride 6 timer
2 °C til 8 °C	7 timer	Skal ikke overskride 5 dager

**MERK** Hvis mer enn én kassett tiner i samme vannbad, må du beregne lengre tiningstid.

- 3 Snu kassetten fem ganger for å blande reagensene.
- 4 Inspiser bunnen på kassetten for å kontrollere at reagensene er tint og uten bunnfall. Bekreft at posisjonene 29, 30, 31 og 32 er tint, ettersom de er de største og tar lengst tid å tine.
- 5 Dunk den forsiktig mot benken for å fjerne luftbobler.  
De beste resultatene oppnås ved å laste inn prøven og konfigurere kjøringen med en gang.

## Klargjøre strømningscellen

- 1 Fjern en ny strømningscelleboks fra oppbevaring ved  $2^{\circ}\text{C}$  til  $8^{\circ}\text{C}$ .
- 2 Fjern foliepakningen fra boksen, og la den stå i romtemperatur i 30 minutter.

## Klargjøre biblioteker for sekvensering

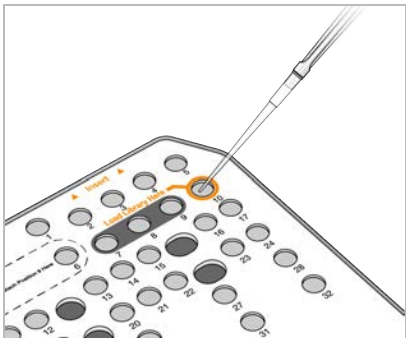
Denaturer og fortynn bibliotekene dine til et lastevolum på 1,3 ml. I praksis kan lastekonsentrasjonen variere avhengig av bibliotekklargjøring og kvantifiseringsmetoder. Fortynning av prøvebiblioteker avhenger av kompleksiteten av oligonukleotidsammenslåinger. Hvis du vil ha mer informasjon om hvordan du klargjør prøvebiblioteker for sekvensering, inkludert bibliotekfortynning og -sammenslåing, finner du dette i avsnittet **Bruk for gjeldende bibliotekklargjøringssett**. Det kreves optimalisering av gruppetetthet på NextSeq 550Dx.

## Laste inn biblioteker på reagenskassetten

- 1 Rengjør folieforseglingen som dekker brønn nr. 10 merket **Load Library Here** (Last inn bibliotek her), med en klut som loer lite.

- 2 Perforer forseglingen med en ren pipettespiss på 1 ml.
- 3 Last 1,3 ml klargjorte biblioteker inn i brønn nr. 10 merket **Load Library Here** (Last inn bibliotek her). Unngå å ta på folieforseglingen mens du pipetterer bibliotekene.

Figur 1 Laste inn biblioteker



## Konfigurere en sekvenseringskjøring

- 1 Logg på NextSeq 550Dx med passordet for Local Run Manager-programvaren.
- 2 Velg **Sequence** (Sekvens) fra startskjermbildet i NOS-programvaren.
- 3 Velg en kjøring fra listen, og velg deretter **Next** (Neste).  
En serie med konfigurasjonsskjermbilder for kjøring åpnes i følgende rekkefølge: Load Flow Cell (Last inn strømningscelle), Load Buffer Cartridge (Last inn bufferkasset), Load Reagent Cartridge (Last inn reagenskasset) og Pre-run Check (Før kjøring-kontroll).
- 4 Når skjermbildet Load Flow Cell (Last inn strømningscelle) vises, rengjør og last deretter inn strømningscellen.
  - ▶ Fjern strømningscellen fra foliepakningen.
  - ▶ Åpne den klare plastpakningen, og fjern strømningscellen
  - ▶ Rengjør glassoverflaten på strømningscellen med en lofri spritserviett. Tørk glasset med en laboratorieklut med lavt loinnhold
  - ▶ Kontroller at glassoverflaten på strømningscellen er ren. Gjenta rengjøringstrinnet ved behov.
  - ▶ Fjern den brukte strømningscellen fra en tidligere kjøring.
  - ▶ Juster strømningscellen over innrettingspinnene, og plasser strømningscellen på stadiet.
- 5 Velg **Load** (Last inn).  
Døren lukkes automatisk, strømningscelle-ID-en vises i skjermbildet, og sensorene kontrolleres.
- 6 Følg programvaremeldingene for å tømme den brukte reagensbeholderen, last inn NextSeq 550Dx-bufferkassetten og last inn NextSeq 550Dx-reagenskassetten.  
Når NextSeq 550Dx-buffer- og reagenskassetene er lastet inn, leser og registrerer programvaren RFID. ID-en til buffer- og reagenskassetene vises i skjermbildet og sensorene kontrolleres.
- 7 Når den automatiserte før kjøring-kontrollen er fullført, velger du **Start**. (Ikke påkrevd hvis automatisk start er konfigurert.)
- 8 Sekvenseringsskjermbildet åpnes når kjøringen starter. Dette skjermbildet gir en visuell fremstilling av kjøringen som pågår, inkludert intensiteter og kvalitetsscorer (Q-scorer).

## Resultater

Real-Time Analysis (RTA) er en integrert programvare som utfører bildeanalyse og basebetegnelse, og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekvenseringscyklus. Når primæranalysen fullføres, starter den valgte Local Run Manager-modulen på NextSeq 550Dx-instrumentet den sekundære analysen automatisk. De sekundære analyseprosessene som er beskrevet her, er for Germline og Somatic Variant-modulene.



## Demultipleksing

Demultipleksing sammenligner hver indeksavlesningssekvens med indekssekvensene som er spesifisert for kjøringen. Ingen kvalitetsverdier blir vurdert i dette trinnet.

Indeksavlesninger blir identifisert ved hjelp av følgende trinn:

- ▶ Prøver blir nummerert med start fra 1 basert på rekkefølgen de er listet opp for kjøringen.
- ▶ Prøvenummer 0 er reservert for klynger som ikke ble tilordnet en prøve.
- ▶ Klynger blir tilordnet en prøve når indekssekvensen samsvarer nøyaktig eller når det er opptil et enkelt misforhold per indeksavlesning.

## FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genererer programvaren intermedieære analysefiler i FASTQ-format, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesninger for hver prøve og tilknyttede kvalitetsscorer. Klynger som ikke besto filter, er ekskludert.

Hver FASTQ-fil inneholder avlesninger for bare én prøve, og navnet på denne prøven er inkludert i FASTQ-filnavnet. I Germline og Somatic Variant-modulene blir åtte FASTQ-filer generert per prøve per oligosammenslåing, fire fra avlesning 1 og fire fra avlesning 2. Disse utdataene gir totalt 8 og 16 FASTQ-filer per prøve for henholdsvis kimbane og somatisk. FASTQ-filer er primære inndata for innretting.

## Innretting

Under innrettingstrinnet innretter den bundne Smith-Waterman-algoritmen klynger fra hver prøve mot amplikonsekvenser angitt i manifestfilen.

Den bundne Smith-Waterman-algoritmen utfører halvglobal sekvensinnretting for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser. I stedet for å sammenligne den totale sekvensen, sammenligner Smith-Waterman-algoritmen segmenter av alle mulige lengder.

Hver paired-end-avlesning blir evaluert med tanke på innretting til de relevante probesekvensene for den avlesningen.

- ▶ Avlesning 1 evalueres mot bakoverkompletteringen av nedstrøms lokusspesifikke oligoer (DLSO, Downstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Avlesning 2 evalueres mot oppstrøms lokusspesifikke oligoer (ULSO, Upstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Hvis starten på en avlesning samsvarer med en probesekvens med ikke mer enn ett misforhold, innrettes den fulle lengden av avlesningen mot PCR-produktmålet for den sekvensen.
- ▶ Hvis starten på en avlesning samsvarer med en probesekvens med høyst tre forskjeller (misforhold eller forskyvninger på grunn av ledende indeler), innrettes den fulle lengden av avlesningen mot amplikonmålet for den sekvensen.
- ▶ Indeler med DLSO og ULSO er ikke observert gitt analysekjemien.

Innrettinger er filtrert fra innrettingsresultater basert på misforholdsfrekvenser over enten interesseregionen eller det fulle amplikonet, avhengig av amplikonlengden. Filtrerte innrettinger blir skrevet i innrettingsfiler som ikke-innrettet og brukes ikke i variantbetegnelse.

## Variantbetegnelse

Variantbetegneren Pisces er designet for å gjøre SNV- og indelvariantbetegnelser fra biblioteker som er klargjort for instrumentet.

## Rapporter og andre utdatafiler

Variantanalysemodulene produserer PDF- og tabulatoravgrensede (\*.txt) rapporter som viser metrikk som f.eks. sekvenseringsdybde og variantantall. Modulene produserer også utdatafiler som f.eks. VCF-filer og genom Variant Call Format (gVCF)-filer til bruk ved variantbetegnelse.

## Kvalitetskontrollprosedyrer

NextSeq 550Dx-programvaren evaluerer hver kjøring, prøve og basebetegnelse mot kvalitetskontrollmetrikk. Positive og negative kontroller er også anbefalt i bibliotekklargjøring og må evalueres. Evaluer kontroller som følger:

- **Negativ kontroll (kontroll uten mal) eller annen negativ kontroll**— må generere forventet resultat. Hvis den negative kontrollen genererer et annet resultat enn forventet, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing, feil registrering av indekseringsprimere eller kontaminering.
- **Positiv kontrollprøve**— må generere forventet resultat. Hvis den positive kontrollen genererer et annet resultat enn forventet, kan det ha oppstått en feil i prøvesporing eller feil registrering av indekseringsprimere.

## Ytelseskarakteristikker

Ytelseskarakteristikker for NextSeq 550Dx-instrumentet ble etablert ved hjelp av Germline og Somatic Variant-modulene med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og bekreftet ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Studier omfattet prøveindeksering, prøvekontaminering, DNA-innmating, analytisk sensitivitet (blindgrense/detekteringsgrense), nøyaktighet, presisjon, metodesammenligning og reproduserbarhet.

De analytiske studiene ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) ble utformet for å evaluere ytelseskrav som tidligere er etablert med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser). Resultatene viser at reagenssett (v2 og v2.5) har sammenlignbar ytelse ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Se *pakningsvedlegget for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* for ytelseskarakteristikker relatert til preanalytiske faktorer, som ekstraksjonsmetoder eller forstyrrende stoffer.

## Definisjoner av beregninger for ytelseskarakteristikker

- 1 Positivt prosentsamsvar (PPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som varianter ved hjelp av en referansemetode som analysen rapporterer korrekt.
  - ▶  $(\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall variantloki})$   
Variantloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant positive (TP). Variantloki rapportert som referansebetegnelser eller som forskjellige variantbetegnelser av analysen, er falskt negative (FN).
- 2 Negativt prosentsamsvar (NPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som villtype ved hjelp av en referansemetode som analysen rapporterer korrekt.
  - ▶  $(\text{antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall villtypeloki})$   
Villtypeloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant negative (TN). Villtypeloki rapportert som varianter av analysen er falskt positive (FP).
- 3 Samlet prosentsamsvar (OPA) beregnes som andelen loki som er korrekt rapportert av analysen i forhold til en referansemetode.
  - ▶  $((\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) + (\text{antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen})) / ((\text{totalt antall variantloki}) + (\text{totalt antall villtypeloki}))$
- 4 Beregningene av PPA, NPA og OPA inkluderer ikke noen betegnelser (variant- eller referanseloki som ikke oppfyller ett eller flere kvalitetsfiltre).
- 5 Autosomal betegnelsesfrekvens beregnes som det totale antallet lokipasserende filtre dividert med det totale antallet posisjoner som er sekvensert for kromosom 1–22. Kromosom X og Y er ekskludert. Denne målingen vurderer ikke samsvaret av betegnelser med referansemetoden.

## Ytelse for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser)

### Prøveindeksering

Prøveindeksprimere, lagt til under bibliotekklargjøring, tilordner en unik sekvens til hvert prøve-DNA. Disse unike sekvensene gjør det mulig å slå sammen flere prøver i en enkelt sekvenseringskjøring. Prøveindeksering brukes for arbeidsprosessene for både kimbane og somatisk. Formålet med denne studien var å etablere minimum (8) og maksimum (96) antall prøver som kan behandles i en enkelt sekvenseringskjøring med NextSeq 550Dx-instrumentet. Åtte unike platinagenomprøver ble testet med 12 ulike indekseringsprimerkombinasjoner per prøve. Prøveresultater fra fire sekvenseringskjøringer som brukte Germline Variant-modulen, ble sammenlignet med platinagenomer versjon 2016-1.0.

For det første settet med kjøring ble 96 unikt indekserte prøvebiblioteker testet med en representativ analyse designet for et bredt utvalg av gener som dekker 12 588 baser per streng over alle 23 humane kromosomer for å verifisere analysens evne til å lage en genotypingbetegnelse konsekvent for en gitt prøve på tvers av ulike kombinasjoner av indekseringsprimere. For det andre settet med kjøring ble åtte unikt indekserte prøvebiblioteker sekvensert i to sekvenseringskjøringer for å verifisere det laveste antallet støttede indekser.

For 96-indekskjøringene var PPA for SNV-er fra 98,7 % til 100 %, PPA for innsetninger og slettinger 100 %, og NPA var 100 % for hver av de 96 indeksskombinasjonene. 8-indekskjøringene hadde PPA-verdier på 100 % (SNV-er, innsetninger og slettinger) og NPA på 100 % for hver av de åtte indeksskombinasjonene.

### Carryover av prøver

NextSeq 550Dx-instrumentet gjør det mulig med sekvensering av flere prøver pluss kontroller i en enkelt sekvenseringskjøring. En studie ble utført for å evaluere graden av carryover av prøver innenfor en sekvenseringskjøring (innenfor kjøring) og mellom sekvenseringskjøringer (kjøring til kjøring). To platinagenomprøver, én mannlig og én kvinnelig, ble testet med en representativ analyse beregnet på å undersøke ulike gener som dekker 12 588 baser (150 amplikoner) over 23 forskjellige kromosomer, inkludert begge kjønnskromosomer. Biblioteker ble sekvensert på NextSeq 550Dx-instrumentet ved hjelp av Germline Variant-modulen. Carryover av mannlige prøver til kvinnelige prøver ble observert gjennom forekomst av Y-kromosomamplikonavlesninger i kvinnelige prøver.

Carryover innenfor en kjøring kan introduseres under gruppegenerering, indekssyklusbasebetegnelser og prøvedemultipleksing. For testing av carryover av prøver innenfor en sekvenseringskjøring ble en biblioteksammenslåing bestående av 46 replikater hver av mannlige og kvinnelige prøver pluss fire ingen mal-kontroller sekvensert én gang på NextSeq 550Dx-instrumentet. Carryover av prøve innenfor kjøring ble vurdert ved å sammenligne Y-kromosomamplikondekning for hvert kvinnelige replikat til gjennomsnittlig Y-kromosomamplikondekning for alle mannlige replikater i sammenslåingen. Medianen observert for carryover innenfor kjøring var 0,084 %.

For testing av carryover av prøve fra kjøring til kjøring ble to biblioteksammenslåinger klargjort og sekvensert etter hverandre på ett NextSeq 550Dx-instrument. Den første sammenslåingen inneholdt 46 replikater for kvinnelig prøve pluss to kontroller uten mal. Den andre sammenslåingen inneholdt 46 replikater for mannlig prøve pluss to kontroller uten mal. Begge sammenslåingene brukte det samme settet med indeksadaptere. Den kvinnelige sammenslåingen ble sekvensert først, etterfulgt av en sekvenseringskjøring med den mannlige sammenslåingen, etterfulgt av en annen gjentatt sekvenseringskjøring av den kvinnelige sammenslåingen. Carryover av prøve fra kjøring til kjøring ble vurdert ved å sammenligne Y-kromosomamplikondekning mellom korresponderende replikater for den gjentatte kjøringen for kvinnelig sammenslåing og kjøring med mannlig sammenslåing. Medianen observert for carryover fra kjøring til kjøring var 0,0076 %

## DNA-innmating

Blod (kimbane)

Blod-DNA-inndataområdet for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-bibliotekklargjøring som bruker arbeidsprosessen for Germline Variant-modulen, ble etablert for NextSeq 550Dx-instrumentet. Dette området ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie med 13 platinagenoprøver og en representativ analyse utformet for å utforske ulike gener som dekker 12 588 baser på mer enn 23 ulike kromosomer. Biblioteket ble sekvensert på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved hjelp av én lot for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser).

Fem prøver ble testet i duplikat ved fem DNA-innmatingsnivåer fra 250 ng til 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng og 12 ng). Åtte prøver ble testet som et enkelt replikat ved hver av de fem DNA-innmatingsnivåene. For å bestemme nøyaktighet ble prøvegenotyper sammenlignet med platinagenomer versjon 2016-1.0. Resultater ble bestemt for hvert innmatingsnivå. PPA for hver varianttype (SNV-er, innsetninger og slettinger) er angitt i **Tabell 1**; NPA er angitt i **Tabell 2**. Alle innmatingsnivåer hadde lignende nøyaktighet. Den anbefalte DNA-innmatingen for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx er 50 ng med 25 ng og 100 ng som nedre og øvre grense for å oppfylle ytelseskarakteristikker.

Tabell 1 PPA-resultater for hver DNA-innmating etter varianttype

DNA-innmating (ng)	Varianttype	Forventede varianter	TP	FN	Variant ingen betegnelser	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	Innsetting	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	Sletting	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

Tabell 2 NPA for hver DNA-innmating

DNA-innmating (ng)	TN	FP	Referanse ingen betegnelser	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 formalinfikserte parafinnstøpte (FFPE) DNA-innmatingsområdet for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-bibliotekklargjøring som bruker arbeidsprosessen for Somatic Variant-modulen, ble etablert for NextSeq 550Dx-instrumentet. DNA-innmatingsområdet ble evaluert ved å utføre en seriell forfynningsstudie med tre platinagenomprøver og en representativ analyse utformet for å utforske ulike gener som dekker 12 588 baser på 23 ulike kromosomer. Platinagenomcellelinje GM12878 og GM12877 var formalinfiksert og innstøpt i parafin etterfulgt av DNA-ekstraksjon. GM12878 ble forfynnet med GM12877 slik at variantallefrekvensene (VAF-ene) for 81 varianter (55 SNV-er, 10 innsetninger og 16 slettinger) var nær 0,025, 0,05 eller 0,10. I tillegg hadde hver prøve 91 varianter med høyere variantfrekvenser opptil 1,0 VAF. Prøver ble behandlet i duplikat ved fem DNA-innmatingsnivåer med gjennomsnittlig deltakvantitativ syklus (dCq) på 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 og 7,8 som målt med TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC-settet. Hvert bibliotek ble sekvensert på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved hjelp av to loter for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser). For bestemmelse av nøyaktighet ble prøvevariantbetegnelser sammenlignet med platinagenomversjon 2016-1.0. PPA for hver varianttype (SNV-er, innsetninger og slettinger) er angitt i [Tabell 3](#); NPA er angitt i [Tabell 4](#). Den anbefalte DNA-innmatingen for varianter ved 0,05 VAF eller høyere er dCq  $\leq$  4 med 4,6 som en nedre grense for å oppfylle ytelseskaraktistikkene.

Tabell 3 PPA-resultater for hver DNA-innmating etter varianttype

Gjennomsnittlig dCq	Variant-type	Forventede varianter	Forventede ingen betegnelser	Målfortynning-VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variant ingen betegnelser	PPA (%)	Variant ingen betegnelser	PPA (%)	Variant ingen betegnelser	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ikke aktuelt.	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	Innsetting	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	Sletting	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

Tabell 4 NPA for hver DNA-innmating

Gjennomsnittlig dCq	Forventet villtype	Målfortynning-VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referanse ingen betegnelser	NPA (%)	Referanse ingen betegnelser	NPA (%)	Referanse ingen betegnelser	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

### Analytisk sensitivitet (blindgrense [LoB] og deteksjonsgrense [LoD])

Denne studien ble utført for å evaluere blindgrense (LoB) og deteksjonsgrense (LoD) for Somatic Variant-modulen på NextSeq 550Dx-instrumentet. Denne ble utført ved hjelp av en representativ analyse utformet for å undersøke ulike gener som dekker 12 588 baser over 23 ulike kromosomer. Platinagenomcellelinje GM12878 og GM12877 var formalinfiksert og innstøpt i parafin etterfulgt av DNA-ekstraksjon. GM12878 ble fortynnet med GM12877 slik at variantfrekvensene for 74 varianter (53 SNV-er, 7 innsetninger og 14 slettinger) var  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 og fortynnet GM12878 (GM12878-D) ble testet over seks sammenhengende startdager med ett instrument, der det ble vekslet mellom to loter av NextSeq 550Dx High Outdata Reagent Kit v2 (300 sykluser), for totalt seks sekvenseringskjøringer. Denne testen førte til 60 replikater for hver variant i GM12878-D og 72 replikater for hvert tilsvarende villtypekoordinat i GM12877 for hver reagenslot. LoB og LoD ble beregnet ved hjelp av den klassiske tilnærmingen angitt i CLSI EP17-A2 ved bruk av det parameterfrie alternativet. LoB og LoD ble beregnet for SNV-er, innsetninger og slettinger hver for seg ved å slå sammen variantfrekvensene for en gitt varianttype. Type I-feilen ble definert som 0,01, og type II-feilen ble definert som 0,05.

For LoB ble de sammenslåtte variantfrekvensene sortert fra lavest til høyest, og 99. plass for hver reagenslot for hver varianttype ble beregnet (Tabell 5). Den Somatic Variant-modulen bruker en cutoff (effektiv LoB) på 0,026 VAF for å fastslå den kvalitative påvisningen av varianter. Beregnet LoB verifiserte at denne cutoffen fører til en type I-feil på høyst 0,01.

Tabell 5 Grense for blank

Varianttype	Totalt antall observasjoner	LoB reagenslot 1 (%)	LoB reagenslot 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Innsetting	504	0,56	0,56
Sletting	1008	1,20	1,20

For LoD ble det beregnet prosentandel for individuell mutasjonsfrekvens for hver reagenslot for hver varianttype som falt under cutoff på 0,026 **Tabell 6**. Fordi prosentandelene var mindre enn type II-feilen på 5 % (0,05), ble medianen for de kombinerte variantfrekvensene beregnet som LoD (**Tabell 6**). LoD for hver varianttype ble tatt som den største av de to verdiene beregnet for de to reagenslotene – 4,97 % for SNV-er, 5,12 % for innsetninger og 5,26 % for slettinger.

Tabell 6 Deteksjonsgrense

Reagenslot	Varianttype	Totalt antall observasjoner	Antall VAF-målinger < 2,6 %	% av VAF-målinger < 2,6 %	Deteksjonsgrense (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Innsetting	420	6	1,4	5,08
	Sletting	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Innsetting	420	5	1,2	5,12
	Sletting	840	7	0,80	5,26

## Nøyaktighet

### Kimbane

Følgende studie ble utført for å finne nøyaktigheten for variantbetegnelse for Germline Variant-modulen på NextSeq 550Dx-instrumentet ved bruk av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser). 13 unike platinagenoprøver ble testet ved hjelp av en representativ analyse beregnet på å undersøke en rekke gener som dekker 12 588 baser (150 amplikoner) over 23 ulike kromosomer. Totalt ni kjøring ble utført ved bruk av tre sekvenseringsinstrumenter, tre reagensloter og tre operatører over fem startdager. Nøyaktighet ble bestemt for SNV-er, innsetninger og slettinger ved å sammenligne resultatene med en godt karakterisert sammensatt referansemetode, platinagenomer versjon 2016-1.0. Sikre genomregioner ble definert basert på denne referansemetoden hvis ikke annet er spesifisert.

Tabell 7 Kort beskrivelse av kimbanesamsvar

Kriterier	Totalt antall observasjoner <sup>1</sup>	Resultat fra observasjon <sup>2</sup>	Resultat fra kjøring <sup>3</sup>
PPA for SNV	819	98,7	> 99,9
PPA for innsetninger	819	95,0	98,9
PPA for slettinger	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Beregnet som antall prøver per kjøring (91) x antall kjøring (9) = 819.

<sup>2</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over alle 9 kjøring.

<sup>3</sup>Laveste verdi når data fra hver kjøring analyseres sammenlagt.

**Tabell 8** inneholder studiedata presentert med positivt og negativt prosentamsvar for hver prøve, der variantresultatene er sammenlignet med platinagenom versjon 2016-1.0 for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, innsetninger og slettinger) er kombinert. Siden referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og innsetninger/slettinger, blir baseresultater uten variant sammenlignet med referansesekvensform hg19 for humant genom for NPA-beregninger.

Tabell 8 Kimbanesamsvar per prøve

Prøve	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Forventede varianter <sup>1</sup>	TP	FN	Variant ingen betegnelser	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

<sup>1</sup> Totalt antall varianter i alle prøvereplikater over 9 kjøringer.

**Tabell 9** inneholder studiedataene presentert for hver prøve, der variantresultatene blir sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referansemetoden. Påvisning evalueres for hver varianttype – SNV-er, innsetninger og slettinger for seg. Referanseposisjoner er ekskludert.

Tabell 9 Kimbanesamsvar per prøve etter varianttype

>Prøve	SNV-er			Innsetninger			Slettinger		
	>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



Prøvene ble ytterligere analysert for betegnelse av små innsetninger og slettinger (indeler). En samlet oppsummering er gitt i **Tabell 10**. Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for innsetninger og 1–25 bp for slettinger.

Tabell 10 Oppsummering for kimbaneindelpåvisning

Varianttype	Forventede varianter	TP	FN	Variant ingen betegnelser	PPA
Innsetting	18522	18018	27	477	99,9
Sletting	17388	17073	0	315	100

Den representative analysen besto av 150 amplikoner utformet for å dekke diverse genomisk innhold. GC-innholdet i amplikonene varierte fra 0,19 til 0,87. Amplikoner hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgjentakelser. Data ble samlet for hvert amplikon (Tabell 11) for å bestemme effekten av genomisk innhold i prosent av riktige betegnelser. Prosent riktige betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det finnes enten feil eller ingen betegnelser.

Tabell 11 Nøyaktighet for kimbaneamplikonnivå

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	I/A	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	I/A	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	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	I/A	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	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	I/A	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	I/A	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	I/A	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	I/A	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	I/A	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	I/A	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	I/A	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	I/A	0,25	67977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	I/A	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	I/A	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	I/A	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	I/A	0,64	57330	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
127	20	746056	746149	94	94	I/A	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	I/A	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	I/A	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	I/A	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	I/A	0,55	0	0	0	I/A
149	Y	2655519	2655609	91	0	I/A	0,48	0	0	0	I/A
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	I/A



Sekvenseringsresultatene for prøve NA12878 ble sammenlignet med en svært sikker genotype for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconene var 92 fullstendig innenfor de genomiske konfidensområdene, 41 ampliconer hadde delvis overlapping og 17 ampliconer hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette utfallet resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Basebetegnelser uten variant ble sammenlignet med referansesekvensform hg19 for humant genom. Nøyaktighetsresultatene er vist i [Tabell 12](#).

Tabell 12 Kimbanesamsvar for prøve NA12878 med NIST-database

Prøve	Antall ampliconer	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610470	0	> 99,9	100	> 99,9

Basert på dataene fra denne kimbanestudien med ni kjøring, kan NextSeq 550Dx-instrumentet konsekvent sekvensere:

- ▶ GC-innhold  $\geq 19$  % (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer med 19 % GC-innhold betegnet riktig med en ingen betegnelse-frekvens på 0,6 %)
- ▶ GC-innhold  $\geq 87$  % (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer med 87 % GC-innhold betegnet riktig med null ingen betegnelser)
- ▶ PolyA-lengder  $\leq 9$  (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyA-gjentakelse på ni nukleotider betegnet riktig med null ingen betegnelser)
- ▶ PolyT-lengder  $\leq 10$  (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyT-gjentakelse på ti nukleotider betegnet riktig med null ingen betegnelser)
- ▶ PolyG-lengder  $\leq 7$  (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyG-gjentakelse på syv nukleotider betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 1.0 %)
- ▶ PolyC-lengder  $\leq 6$  (alle betegnede baser i 2457 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyC-gjentakelse på seks nukleotider betegnet riktig med null ingen betegnelser)
- ▶ Gjentatte lengder for dinukleotid  $\leq 11x$  (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer med 11x dinukleotidrepetisjoner ble betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- ▶ Gjentatte lengder for trinukleotid  $\leq 5x$  (alle betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer med 5x trinukleotidrepetisjoner ble betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- ▶ Innsettslengder  $\leq 24$  (66 343 av 66 370 betegnede baser i 819 sekvenserte ampliconer som inneholder en 24-nukleotidinnsetting betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 1,2 %. Ingen uriktige betegnelser forekom i region som inneholder 24-nukleotidinnsetting)
- ▶ Slettingslengder  $\leq 25$  (alle betegnede baser i 2457 sekvenserte ampliconer som inneholder en 25-nukleotidsletting betegnet riktig med null ingen betegnelser)

### Somatisk

Studien som beskrives her, ble brukt for å vurdere variantbetegnelsesnøyaktigheten for Somatic Variant-modulen på NextSeq 550Dx-instrumentet ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykkluser).

Denne studien brukte en representativ analyse beregnet på å undersøke en rekke gener som dekker 12 588 baser (150 ampliconer) over 23 forskjellige kromosomer. Platinagenom-DNA ble ekstrahert fra FFPE-behandlede blokker for å generere seks unike prøver for evaluering i studien.

Prøve GM12877-DNA ble fortynnet med prøve GM12878-DNA for å opprette GM12877-D5 og GM12877-D7 som et sett med unike heterozygote varianter med variantfrekvenser nær 5 % og 7 %. Prøve GM12878-DNA ble på samme måte fortynnet med prøve GM12877-DNA for å opprette GM12878-D5 og GM12878-D7. Hver av prøvene ble testet i tre eksemplarer, unntatt de fortynnede prøvene, som ble testet i seks replikater. Totalt ni kjøring ble utført ved bruk av tre sekvenseringsinstrumenter, tre reagensloter og tre operatører over fem startdager. Nøyaktighet ble bestemt for SNV-er, innsettinger og slettinger ved å sammenligne resultatene med en godt karakterisert sammensatt referansemetode, platinagenomer versjon 2016-1.0. Sikre genomregioner ble definert basert på denne referansemetoden hvis ikke annet er spesifisert.

Tabell 13 Kort beskrivelse av somatisk samsvar

Kriterier	Totalt antall observasjoner <sup>1</sup>	Resultat fra observasjon <sup>2</sup>	Resultat fra kjøring <sup>3</sup>
PPA for SNV	378	98,9	99,9
PPA for innsetninger	378	96,9	99,9
PPA for slettinger	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Beregnet som antall prøver per kjøring (42) x antall kjøring (9) = 378.

<sup>2</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over alle 9 kjøring.

<sup>3</sup>Laveste verdi når data fra hver kjøring analyseres sammenlagt.

Tabell 14 inneholder studiedata presentert med positivt og negativt prosentamsvar for hver prøve, der variantresultatene er sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referansemetoden for PPA-beregninger. De tre varianttypene (SNV-er, innsetninger og slettinger) er kombinert. Siden referansemetoden kun gir resultater for de enkle nukleotidvariantene og innsetninger/slettinger, blir baseresultater uten variant sammenlignet med referansesekvensform hg19 for humant genom for NPA-beregninger.

Tabell 14 Somatisk samsvar per prøve

Prøve	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	Forventet	TP	FN	Variant ingen betegnelser	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

**Tabell 15** inneholder studiedataene presentert for hver prøve, der variantresultatene blir sammenlignet med den godt karakteriserte sammensatte referansemotoden. Påvisning evalueres for hver varianttype – SNV-er, innsetninger og slettinger for seg. Referanseposisjoner er ekskludert.

Tabell 15 Somatisk samsvar per prøve etter varianttype

Prøve	SNV-er			Innsetninger			Slettinger		
	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

Prøvene ble ytterligere analysert for betegnelse av små innsetninger og slettinger (indeler) (Tabell 16). Det var totalt 71 indeler, som varierte i størrelse fra 1–24 bp for innsetninger og 1–25 bp for slettinger.

Tabell 16 Oppsummering for somatisk indelpåvisning

Varianttype	Forventede varianter	TP	FN	Variant ingen betegnelser	PPA
Innsetting	10773	10282	9	482	99,2
Sletting	11502	10667	5	830	> 99,9

De 150 ampliconene ble utformet for å dekke diverse genomisk innhold. GC-innholdet i ampliconene varierte fra 0,19 til 0,87 %. Ampliconer hadde også et utvalg av enkle nukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotidgjentakelser. Data ble samlet for hvert amplicon (Tabell 17) for å bestemme effekten av genomisk innhold i prosent av riktige betegnelser. Prosent riktige betegnelser består av variant- og referansebetegnelser og er mindre enn 100 % hvis det finnes enten feil eller ingen betegnelser.

Tabell 17 Nøyaktighet for somatisk ampliconnivå

Amplicon	Kromosom	Ampliconstart	Ampliconslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplicon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	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	I/A	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27459	0	136	99,5

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	I/A	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	I/A	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	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	I/A	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	I/A	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	I/A	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	I/A	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	I/A	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	I/A	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	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	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	I/A	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	I/A	0,25	31360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26762	0	76	99,7



Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
99	15	89817413	89817503	91	91	I/A	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	I/A	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	I/A	0,37	34386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
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	I/A	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	I/A	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	I/A	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	I/A	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	I/A	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonstart	Amplikonslutt	Analysert fragment-størrelse	Baser i sikre regioner	Genomisk innhold for amplikon	GC-innhold	Riktige betegnelser	Feil betegnelser	Ingen betegnelser	% riktige betegnelser
141	22	32439233	32439329	97	97	I/A	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	I/A	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	I/A	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	I/A	0,55	0	0	0	IA
149	Y	2655519	2655609	91	0	I/A	0,48	0	0	0	IA
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	IA

Sekvenseringsresultatene for prøve GM12878 ble sammenlignet med en svært sikker genotype for NA12878, etablert av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconene var 92 fullstendig innenfor de genomiske konfidensområdene, 41 ampliconer hadde delvis overlapping og 17 ampliconer hadde ingen overlapping i NIST-sekvensen. Dette utfallet resulterte i 10 000 koordinater per replikat for sammenligning. Basebetegnelser uten variant ble sammenlignet med referansesekvensform hg19 for humant genom. Nøyaktighetsresultatene er vist i [Tabell 18](#).

Tabell 18 Somatisk samsvar for prøve GM12878 med NIST-database

Prøve	Antall ampliconer	Gjennomsnittlig betegnelsesfrekvens	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Basert på dataene fra denne somatiske studien med ni kjøring, kan NextSeq 550Dx-instrumentet konsekvent sekvensere:

- ▶ GC-innhold  $\geq 19$  % (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer med 19 % GC-innhold betegnet riktig med en ingen betegnelse-frekvens på 2,6 %)
- ▶ GC-innhold  $\geq 87$  % (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer med 87 % GC-innhold betegnet riktig med en ingen betegnelse-frekvens på 0,6 %)
- ▶ PolyA-lengder  $\leq 9$  (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyA-gjentakelse på ni nukleotider betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 2,5 %)
- ▶ PolyT-lengder  $\leq 10$  (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyT-gjentakelse på ti nukleotider betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på mindre enn 0,1 %)
- ▶ PolyG-lengder  $\leq 6$  (alle betegnede baser i 2268 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyG-gjentakelse på seks nukleotider betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,5 %)
- ▶ PolyC-lengder  $\leq 6$  (alle betegnede baser i 756 sekvenserte ampliconer som inneholder en PolyC-gjentakelse på seks nukleotider betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,4 %)
- ▶ Gjentatte lengder for dinukleotid  $\leq 4x$  (alle betegnede baser i 1890 sekvenserte ampliconer med 4x dinukleotidrepetisjoner ble betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,9 %)
- ▶ Gjentatte lengder for trinukleotid  $\leq 5x$  (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer med 5x trinukleotidrepetisjoner ble betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 1,4 %)
- ▶ Innsettslengder  $\leq 23$  (alle betegnede baser i 378 sekvenserte ampliconer med 23-nukleotidinnsetting ble betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,8 %)
- ▶ Slettingslengder  $\leq 25$  (alle betegnede baser i 1134 sekvenserte ampliconer som inneholder en 25-nukleotidsletting betegnet riktig med ingen betegnelse-frekvens på 0,7 %)

## Presisjon

NextSeq 550Dx-instrumentets presisjon ble bestemt ved testing av 13 unike platinagenomprøver ved hjelp av tre instrumenter, tre reagensloter og tre operatører til å generere ni sekvenseringskjøringer i løpet av fem startdager. Representantanalysen, prøvene og referansemetoden er de samme som beskrevet for kimbanenøyaktighetsstudien. Presisjonsbidrag ble bestemt ved varianskomponentanalyse ved hjelp av VAF som responsvariabel og beregning av standardavvik på komponentnivå for instrumentet, reagensloten, operatøren og startdagen ([Tabell 19](#)). Det totale antallet observasjoner brukt i analysen for variabilitet for hver instrumentkomponent, operatør eller reagenslot, var 699, 176 og 235 for henholdsvis SNV-er, innsettinger og slettinger.

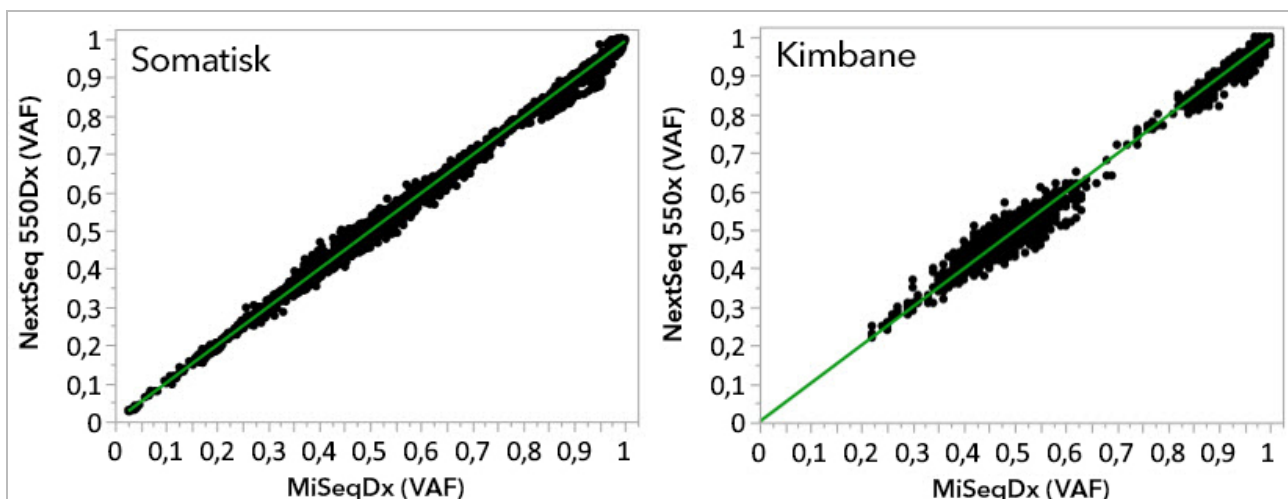
Tabell 19 Presisjonsresultater for NextSeq 550Dx-instrumentet (standardavvik)

Komponent	Varianttype	Standardavvik for komponent		Totalt standardavvik	
		Maks.	Median	Maks.	Median
Lot-	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Innsetting	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Sletting	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument-	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Innsetting	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Sletting	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatør-	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Innsetting	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Sletting	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dag-	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Innsetting	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Sletting	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Metodesammenligning (sekvenseringsplattform)

Fullblod- og FFPE-prøver ble vurdert på NextSeq 550Dx-instrumentet og MiSeqDx-instrumentet ved bruk av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-arbeidsprosessene for kimbane og somatisk. Variantfrekvenssamsvar for blod- og FFPE-prøver ble evaluert ved hjelp av flere representative analyser. **Figur 2** plottes VAF-korrelasjonen mellom de to instrumentene for én representativ analyse og **Tabell 20** oppsummerer denne korrelasjonen med analysepanel. Basert på den sterke korrelasjonen mellom MiSeqDx-instrument og NextSeq 550Dx-instrument bestemmes ytelsesegenskaper knyttet til preanalytiske faktorer (f.eks. ekstraksjonsmetoder eller forstyrrende stoffer) som gjeldende for begge instrumentene. Se pakningsvedlegget for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx for mer informasjon.

Figur 2 VAF-korrelasjon for MiSeqDx- til NextSeq 550Dx-instrumenter for FFPE- (venstre) og blodprøver (høyre) ved bruk av analyse 1



Tabell 20 Metodesammenligningsresultater ved bruk av unike blod- og FFPE-prøver

Kilde for gDNA	Analyse (oligopanel)	Biologiske replikater (prøver)	Tekniske replikater (per prøve)	Observasjoner (antall varianter)	Helning	Skjæringspunkt	Korrelasjon (R <sup>2</sup> )
Blod	Analyse 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Blod	Analyse 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analyse 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Analyse 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup>To datapunkter ble fjernet basert på angitt grense for Gemline Variant-modulen.

<sup>2</sup>Bestemmelseskoeffisienten for VAF-plottene som illustrert i figur 2.

## Reproduserbarhet

Reproduserbarheten for NextSeq 550Dx-instrumentet ble evaluert med platinagenomprøver med en representativ analyse beregnet på å undersøke en rekke gener som dekker 12 588 baser over 23 forskjellige kromosomer ved bruk av 150 amplikoner. Kimbanetesting besto av sju replikater av 13 prøver; somatisk testing besto av seks replikater av sju prøve ved ulike VAF-nivåer. Prøver ble klargjort med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testing ble utført på tre eksterne steder ved hjelp av én lot av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser). Et enkelt NextSeq 550Dx-instrument ble brukt på hvert sted. To operatører gjennomførte testingen på hvert sted. Hver operatør utførte testing på tre ikke-sammenhengende startdager for hver prøvetype i totalt 36 kjøring over de tre stedene. Denne testingen førte til 18 kjøring for hver av kimbane- og somatisk-arbeidsflytene.

### Kimbane

Kimbanevarianter med VAF-nivå på  $\geq 0,2$  rapporteres som positive (variant). For forventede positive kimbanevarianter ble dataene evaluert for ingen betegnelse-frekvens og riktig positiv betegnelsesfrekvens innen hver varianttype (SNV, innsetting, sletting). **Tabell 21** oppsummerer de observerte frekvensene, sammen med nedre og øvre 95 % konfidensnivåer (LCL/UCL) beregnet ved hjelp av Wilson-scoremetoden, for hver varianttype.

Tabell 21 Kimbanebetegnelsesobservasjoner for forventede positive resultater etter varianttype

Varianttype	Ingen betegnelse			Riktig positiv betegnelse				
	Observert	Totalt	Prosent	Observert	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Innsettinger	1026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Slettinger	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Kimbanevarianter med VAF-nivå på  $< 0,2$  rapporteres som negative (villtype). For forventede negative kimbanevarianter ble dataene evaluert for ingen betegnelser og korrekt villtypebetegnelsesfrekvenser. **Tabell 22** oppsummerer de observerte frekvensene, sammen med nedre og øvre 95 % konfidensnivåer (LCL/UCL) beregnet ved hjelp av Wilson-scoremetoden.

Tabell 22 Kimbanebetegnelsesobservasjoner for forventede negative resultater

Varianttype	Ingen betegnelse			Riktig negativ betegnelse				
	Observert	Totalt	Prosent	Observert	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
Villtype	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Kimbanevarianter med VAF-nivå  $\geq 0,2$  og  $< 0,7$  kalles positivt heterozygote for varianten, og varianter med VAF-nivå  $\geq 0,7$  kalles positivt homozygote for varianten. Kimbanepøver med heterozygote varianter ble brukt for å avgjøre om den iboende variabiliteten av analysen ville påvirke genotypebetegnelsen. Cx ble bestemt for begge cutoffter (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), der x er andelen gjentatte tester som overstiger cutoff. For nedre cutoff på 0,2 VAF var Cx  $\geq 99,999\%$ , noe som angir at  $\geq 99,999\%$  heterozygote varianter ville blitt betegnet heterozygote. Når det gjelder øvre cutoff på 0,7 VAF var Cx  $\leq 0,001\%$ , noe som angir at  $\leq 0,001\%$  heterozygote varianter ville blitt betegnet homozygote. **Tabell 23** sammenfatter resultatene etter varianttype.

Kimbanevarianter med VAF-nivå  $\geq 0,2$  og  $< 0,7$  kalles positivt heterozygote for varianten, og varianter med VAF-nivå  $\geq 0,7$  kalles positivt homozygote for varianten. Kimbanepøver med heterozygote varianter ble brukt for å avgjøre om den iboende variabiliteten av analysen ville påvirke genotypebetegnelsen. Cx ble bestemt for begge cutoffter (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), der x er andelen gjentatte tester som overstiger cutoff. Med hensyn til nedre cutoff på 0,2 VAF var Cx  $\geq 99,999\%$ , noe som angir at  $\geq 99,999\%$  heterozygote varianter ville blitt betegnet heterozygote. For øvre cutoff på 0,7 VAF var Cx  $\leq 0,001\%$ , noe som angir at  $\leq 0,001\%$  heterozygote varianter ville blitt betegnet homozygote. **Tabell 23** sammenfatter resultatene etter varianttype.

Tabell 23 Kimbane-Cx-verdier for heterozygote varianter

Varianttype	Cutoff ved 0,2 VAF	Cutoff ved 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Innsettinger	24/24	24/24
Slettinger	35/35	35/35
Totalt	153	153

### Somatisk

Somatiske varianter med VAF-nivåer  $\geq 0,026$  rapporteres som positive (variant). Observasjoner med VAF-nivåer  $\geq 0,01$  og  $< 0,026$  vurdert som tvetydige når det gjelder denne analysen (verken positive eller negative, flagget som lav variantfrekvens). For å vurdere ytelsen ble resultatene beregnet på tre måter:

- ▶ I beste fall: Et tvetydig resultat ble ansett som en riktig positiv betegnelse (samsvar med forventede resultater)
- ▶ I verste fall: Et tvetydig resultat ble ansett som en feil betegnelse (ikke samsvar med forventede resultater)
- ▶ Eksklusjon: Et tvetydig resultat ble ekskludert fra analysen

Tre tabeller, **Tabell 24**, **Tabell 25** og **Tabell 26**, sammenfatter betegnelsesresultatene for henholdsvis beste tilfelle, verste tilfelle og eksklusjonstilfelle sammen med nedre og øvre 95 % konfidensnivå (LCL/UCL) beregnet ved hjelp av Wilson Resultat-metoden.

Tabell 24 Somatiske betegnelsesobservasjoner for forventede positive resultater etter varianttype (beste fall)

Varianttype	Riktig positiv betegnelse				
	Observert	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Innsettinger	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Slettinger	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabell 25 Somatiske betegnelsesobservasjoner for forventede positive resultater etter varianttype (verste fall)

Varianttype	Riktig positiv betegnelse				
	Observert	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Innsettinger	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Slettinger	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabell 26 Somatiske betegnelsesobservasjoner for forventede positive resultater etter varianttype (tvetydige resultater fjernet)

Varianttype	Riktig positiv betegnelse				
	Observert	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Innsettinger	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Slettinger	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatiske varianter med VAF-nivå  $< 0,01$  rapporteres som negative (villtype) betegnelser. For forventede negative somatiske steder ble dataene evaluert for ingen betegnelse-frekvens og korrekt villtypebetegnelsesfrekvens. Korrekte villtypebetegnelser ble bestemt ved å ekskludere ingen betegnelser og trekke fra de observerte betegnelse som falt inn i den tvetydige sonen (VAF-nivåer  $\geq 0,01$  og  $< 0,026$ ) så vel som de uriktige betegnelse som var over cutoffen (VAF-nivåer  $\geq 0,026$ ) fra totalen. Tabell 27 sammenfatter de observerte, totale og prosentvise resultatene for negative somatiske steder for ingen betegnelse-frekvens og korrekt villtypebetegnelsesfrekvens sammen med nedre og øvre 95 % konfidensnivå (LCL/UCL) beregnet ved hjelp av Wilson Resultat-metoden.

Tabell 27 Somatiske betegnelsesobservasjoner for forventede negative resultater

Varianttype	Ingen betegnelse			Riktig betegnelse						
	Observert	Totalt	Prosent	Tvetydig	Feil	Riktig	Totalt	Prosent	95 % LCL	95 % UCL
Villtype	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Somatiske prøver ved ulike VAF-nivåer for samme variant ble evaluert for å påvise C95 for analysen (innen hver varianttype). For å evaluere variabilitet nær analysecuttoff ble det brukt prøver som hadde forventede VAF-nivåer mellom 0,02 og 0,07. C95 ble påvist for hver variant, med høyeste C95 for hver varianttype rapportert i Tabell 28.

Tabell 28 Oppsummering for somatisk C95

Varianttype	N	C95
SNV	74	0,0613
Innsetting	24	0,0573
Sletting	33	0,0575



## Ytelse for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser)

### Oversikt

NextSeq 550Dx støttes av to reagenssett: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). For å vise at NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) kan oppfylle krav til analytisk ytelse verifisert og validert med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser), ble det gjennomført studier med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Det ble utført to bibliotekklargjøringer ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, én med Germline-arbeidsprosessen og den andre med Somatic-arbeidsprosessen. Biblioteker fra hver arbeidsprosess ble testet med tre loter av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) ved hjelp av tre NextSeq 550Dx-instrumenter. I tillegg omfattet testing for hver arbeidsprosess én kjøring med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser).

### Analytisk sensitivitet (blindgrense [LoB] og deteksjonsgrense [LoD])

Verifisering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) viste at NextSeq 550Dx-instrumentet kunne påvise varianter ved 0,05 VAF med en type II-feil  $\leq 0,05$ , og at cutoff på 0,026 VAF som Somatic Variant-modulen (effektiv LoB) bruker, støtter en type I-feil  $\leq 0,01$ . Basert på disse påstandene forventes det at en variant ved 0,05 VAF er større enn 0,026 VAF 95 % av tiden, og at en villtypeposisjon er mindre enn 0,026 VAF 99 % av tiden. For å sikre at disse påstandene ble oppfylt med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser), ble gjentatte målinger utført på NextSeq 550Dx-instrumentet med prøver av villtype (LoB-prøver) og med prøver som inneholdt varianter ved 0,05 VAF (LoD-prøver) ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Andelen betegnelser over og under cutoff på 0,026 ble deretter sammenlignet med påstandene som ble etablert med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser).

Testingen omfattet to LoD-prøver hver med et unikt sett med varianter målrettet mot 0,05 VAF og tilsvarende LoB-prøver som var villtype for målrettede varianter. For bibliotekklargjøring ble LoD- og LoB-prøver behandlet i replikater på henholdsvis åtte og syv ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteker ble først sekvensert ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) for å identifisere varianter / genomiske koordinater for LoB/LoD-evaluering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Alle varianter med gjennomsnittlig VAF mellom 0,045 og 0,055 (LoD-varianter) basert på resultatene fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser), ble brukt til LoD-analyse (N = 51 varianter). De 51 tilsvarende genomiske koordinatene ble vurdert for LoB-analyse.

For evaluering av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) ble biblioteker sekvensert i tre kjøring i løpet av tre påfølgende dager ved hjelp av samme instrument og reagenssettlot. Denne testingen utgjorde 24 replikater for hver av de 51 LoD-variantene og 21 replikater for hver av de tilsvarende villtypeposisjonene. Andelen villtypebetegnelser med VAF  $< 0,026$  er oppgitt i [Tabell 29](#). Andelen av LoD-variantbetegnelser med VAF større enn eller lik 0,026 er oppgitt i [Tabell 30](#).

Tabell 29 Andelen betegnelser  $< 0,026$  for villtypeposisjoner (evaluering av LoB-påstand)

Varianttype	Evaluerte posisjoner	Totalt antall observasjoner	Antall VAF-målinger $\geq 2,6$ %	Andel $< 2,6$ %	Andel 95 % Konfidensintervall
SNV	32	672	0	1	0,994 – 1
Innsetting	11	231	0	1	0,984 – 1
Sletting	8	168	0	1	0,978 – 1

Tabell 30 Andelen betegnelser  $\geq 0,026$  VAF for LoD-varianter (evaluering av LoD-påstand)

Varianttype	Evaluerte posisjoner	Totalt antall observasjoner	Antall VAF-målinger < 2,6 %	Antall VAF-målinger $\geq 2,6$ %	Andel $\geq 2,6$ %	Andel 95 % Konfidensintervall
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993 – 1
Innsetting	11	264	3	261	0,989	0,967 – 0,996
Sletting	8	192	2	190	0,99	0,963 – 0,997

## Nøyaktighet

### Kimbane

Følgende studie ble gjennomført for å vurdere variantbetegnelsesnøyaktigheten med Germline Variant-modulen ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Tolv unike platinagenoprøver ble testet ved hjelp av en representativ analyse. Totalt 11 kjøring ble utført ved hjelp av tre NextSeq 550Dx-instrumenter og tre NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

Nøyaktighet ble bestemt for SNV-er, innsetninger og slettinger ved å sammenligne resultatene med en godt karakterisert sammensatt referansem metode, platinagenomer versjon 2016-1.0. Nøyaktighetsresultater fra en enkelt sekvenseringskjøring med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) er oppgitt som referanse. Et sammendrag av resultatene er oppgitt i [Tabell 31](#).

Tabell 31 Kort beskrivelse av kimbanesamsvar

Kriterier	Totalt antall observasjoner (v2.5) <sup>1</sup>	Resultat fra observasjon (v2.5) <sup>2</sup>	Resultat fra observasjon (v2) <sup>3</sup>	Resultat fra kjøring (v2.5) <sup>4</sup>	Resultat fra kjøring (v2) <sup>4</sup>
PPA for SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA for innsetninger	1056	100	100	100	98,9
PPA for slettinger	1056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Beregnet som antall prøver per kjøring x antall kjøring (96 prøver per kjøring x 11 kjøring = 1056 observasjoner).

<sup>2</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over alle kjøring (basert på 11 kjøring for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over 1 kjøring (totalt 96 observasjoner).

<sup>4</sup>Laveste verdi når data fra hver kjøring analyseres sammenlagt.

### Somatisk

Følgende studie ble gjennomført for å vurdere variantbetegnelsesnøyaktigheten for Somatic Variant-modulen på NextSeq 550Dx-instrumentet ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser). Ti platinagenome FFPE-prøver (to med varianter fortennet ned til 0,05 VAF) ble testet ved hjelp av en representativ analyse. Totalt 11 kjøring ble utført ved hjelp av tre NextSeq 550Dx-instrumenter og tre loter av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

Nøyaktighet ble bestemt for SNV-er, innsetninger og slettinger ved å sammenligne resultatene med en godt karakterisert sammensatt referansem metode, platinagenomer versjon 2016-1.0. Nøyaktighetsresultater fra en enkelt sekvenseringskjøring med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) er oppgitt som referanse. Et sammendrag av resultatene er oppgitt i [Tabell 32](#).

Tabell 32 Kort beskrivelse av somatisk samsvar

Kriterier	Totalt antall observasjoner (v2.5) <sup>1</sup>	Resultat fra observasjon (v2.5) <sup>2</sup>	Resultat fra observasjon (v2) <sup>3</sup>	Resultat fra kjøring (v2.5) <sup>4</sup>	Resultat fra kjøring (v2) <sup>4</sup>
PPA for SNV	528	100	100	100	100
PPA for innsetninger	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA for slettinger	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup>Beregnet som antall prøver per kjøring x antall kjøringer (48 prøver per kjøring x 11 kjøringer = 528 observasjoner).

<sup>2</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over alle kjøringer (basert på 11 kjøringer for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

<sup>3</sup>Lavest observerte verdi ved prøverepлика over 1 kjøring (totalt 96 observasjoner).

<sup>4</sup>Laveste verdi når data fra hver kjøring analyseres sammenlagt.

## Presisjon

### Kimbane

Presisjonen til NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) med Germline Variant-modulen ble evaluert ved hjelp av platinagenomprøver og en representativ analyse. Testingen besto av et enkelt bibliotekklargjøring ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, og omfattet 12 prøver behandlet med åtte replikater hver. Biblioteker ble sekvensert med tre loter av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter for totalt ni sekvenseringskjøringer.

Prøver med heterozygote varianter ble brukt for å avgjøre om den iboende variabiliteten av analysen ville påvirke genotypebetegnelsen (N = 153 unike heterozygote varianter). Cx ble bestemt for begge cutoffter for Germline Variant-modulen (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), der x er andelen gjentatte tester som overstiger cutoff. For den nedre cutofften på 0,2 VAF var varianten med minimum Cx for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) > 99,9 %, noe som indikerer at > 99,9 % av heterozygote varianter ville blitt betegnet heterozygote. For den øvre cutofften på 0,7 VAF var varianten med maksimal Cx for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) < 1,5 %, noe som indikerer at ≤ 1,5 % av heterozygote varianter ville blitt betegnet homozygote. **Tabell 33** sammenfatter resultatene etter varianttype. Cx-verdier fra den enkle sekvenseringskjøringen ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) er oppgitt som referanse.

Tabell 33 Kimbane-Cx-verdier for heterozygote varianter

Varianttype	N	Cutoff ved 0,2 VAF		Cutoff ved 0,7 VAF	
		Min. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Min. Cx (v2) <sup>2</sup>	Maks. Cx (v2.5) <sup>1</sup>	Maks. Cx (v2) <sup>2</sup>
SNV	94	> 99,9 %	> 99,9 %	1,5%	1,0%
Innsetninger	24	100 %	100 %	0%	< 0,1 %
Slettinger	35	100 %	> 99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

<sup>1</sup>Cx-verdier basert på estimer av totalt standardavvik fra varianskomponentanalyse.

<sup>2</sup>Cx-verdier basert på prøvestandardavvik.

## Somatisk

Presisjonen til NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) med Somatic Variant-modulen ble evaluert ved hjelp av platinagenome FFPE-prøver og en representativ analyse. Testingen besto av et enkelt bibliotekklargjøring ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, og omfattet to prøver med åtte replikater hver. Biblioteker ble sekvensert ved hjelp av tre loter av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter for totalt ni sekvenseringskjøringer.

Somatisk varianter med forventede VAF-nivåer  $\leq 0,10$  VAF (N = 131 unike varianter) ble brukt for å evaluere instrumentvariabilitet nær Somatic Variant-modulens VAF-cuttoff (somatiske varianter med VAF-nivå  $\geq 0,026$  kalles positive for varianten). C95-verdier ble bestemt for hver av de somatiske variantene. C95-verdier representerer VAF der sannsynligheten for å være større enn Somatic Variant-modulens VAF-cuttoff, er 95 %. De høyeste C95-verdiene etter varianttype er rapportert i [Tabell 34](#). C95-resultater fra en enkelt sekvenseringskjøring ved hjelp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) er oppgitt som referanse.

Tabell 34 Sammendrag av somatisk C95

Varianttype	Antall evaluerte varianter	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Innsettinger	24	0,062	0,061
Slettinger	33	0,060	0,060

<sup>1</sup>C95-verdier basert på estimer av totalt standardavvik fra varianskomponentanalyse.

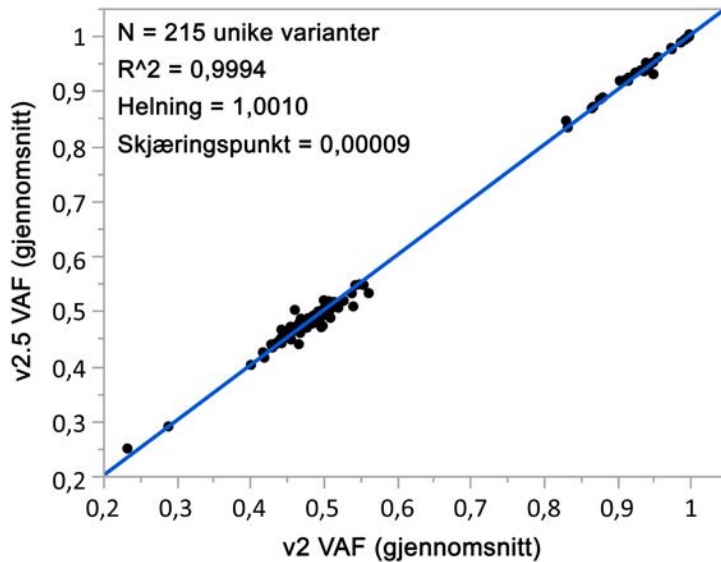
<sup>2</sup>C95-verdier basert på prøvestandardavvik.

## Metodesammenligning (reagenssett)

### Kimbane

De gjennomsnittlige VAF-ene fra 215 unike varianter ble evaluert over NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) ved hjelp av resultater generert fra Germline Variant-modulen. VAF-gjennomsnitt ble beregnet ut ifra 11 sekvenseringskjøring (v2.5) og én sekvenseringskjøring (v2). Minst åtte replikater ble brukt for å beregne gjennomsnittet for hver variant. [Figur 3](#) plotter VAF-korrelasjonen mellom de to reagenssettene. Basert på den sterke lineære VAF-korrelasjonen og likheten i resultatene mellom reagenssett, ble ytelseskaraktistikker som først ble verifisert og validert med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) med Germline Variant-modulen bestemt å være gjeldende for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

Figur 3 Germline Variant-modulens variantallelfrekvens (VAF)-korrelasjon mellom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

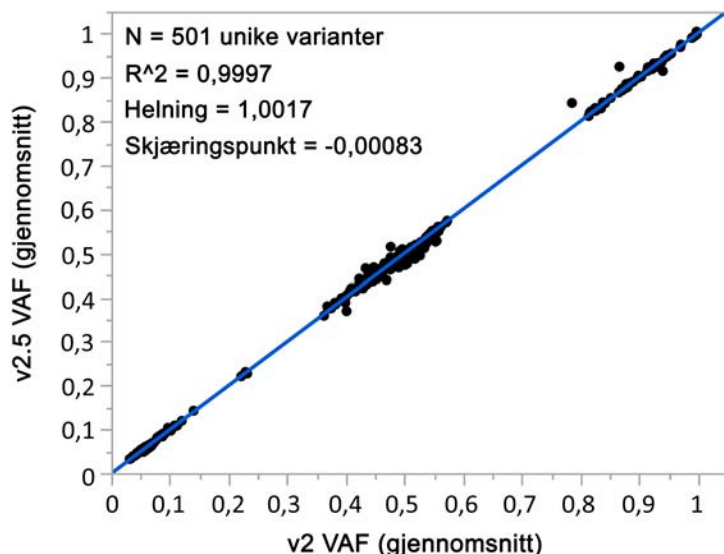


### Somatisk

De gjennomsnittlige VAF-ene for 501 unike varianter ble evaluert over NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) ved hjelp av resultater generert fra Somatic Variant-modulen. VAF-gjennomsnitt ble beregnet ut ifra 11 sekvenseringskjøring (v2.5) og én sekvenseringskjøring (v2). Minst tre replikater ble brukt for å beregne gjennomsnittet for hver unike variant.

Figur 4 plottes VAF-korrelasjonen mellom de to reagenssettene. Basert på den VAF-korrelasjonen og likheten i resultatene mellom reagenssett, ble ytelseskaraktistikker som ble verifisert og validert med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) med Somatic Variant-modulen bestemt å være gjeldende for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).

Figur 4 Somatic Variant-modulens variantallelefrekvens (VAF)-korrelasjon mellom NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser).



## Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 100000030326 v06	Mai 2022	Oppdateringer gjort for å rette opp innhold lagt til utilsiktet fra kildeprogramvare.
Dokumentnr. 100000030326 v05	November 2021	La til setning om advarsler og forsiktighetsregler når det gjelder rapportering av alvorlige hendelser. La til en merknad til prosedyreprinsipper som spesifiserer tiltenkt bruker. Fjernet referanse til High Output Reagent Kit v2 (300 sykluser). La til referanse til High Output Reagent Kit v2.5 (75 sykluser).
Dokumentnr. 100000030326 v04	August 2021	La til tabell for revisjonslogg. Oppdaterte adresse for EU-autorisert representant.

## Patenter og varemerker

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

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

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

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

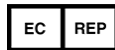
© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformasjon



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



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

### **Australsk sponsor**

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

## Produktmerking

Du finner en fullstendig liste over og forklaring på symboler som kan stå på produktemballasjen og i dokumentasjonen for settet du har, på [support.illumina.com](http://support.illumina.com).