

Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK. ENDAST FÖR EXPORT.

Katalognr 20005715

Avsedd användning

NextSeq 550Dx-instrument är avsedd för sekvensering av DNA-bibliotek när den används med *in vitro*-diagnostiska analyser. NextSeq 550Dx-instrument ska användas med specifika registrerade, certifierade eller godkända *in vitro*-diagnostiska reagens och analysprogramvara.

Grundläggande principer

Illumina NextSeq 550Dx-instrument är avsett för sekvensering av DNA-bibliotek med *in vitro*-diagnostiska analyser och för användning av kvalificerad och utbildad laboratoriepersonal som är utbildad i användningen av *in vitro*-diagnostiska procedurer som utförs i ett klinisk laboratorium. För sin inmatning NextSeq 550Dx använder den bibliotek genererade från DNA där provindex och infångningssekvenser läggs till amplifierade mål. Provbibliotek fångas upp i en flödescell och sekvenseras av instrumentet med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes). I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att detektera fluorescensmärkta enkelnukleotidbaser när de införlivas i växande DNA-strängar. Programvaran Real-Time Analysis (RTA) utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar en kvalitetspoäng till varje bas för varje sekvenseringscykel. När den primära analysen är klar kan den sekundära analysen genomföras i instrumentet för att utföra basbestämning. NextSeq 550Dx använder olika moduler för sekundär analys beroende på arbetsflöde. För modulen Germline Variant (könsellsvariant) eller modulen Somatic Variant (somatisk variant) omfattar behandlingen demultiplexning, FASTQ-filgenerering, linjering, variantbestämning och generering av filer i variantbestämningsformat (VCF och gVCF). VCF- och gVCF-filerna innehåller information om varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom.

Dubbel startkonfiguration

NextSeq 550Dx har en dubbel startkonfiguration för att möjliggöra användning av instrumentet i antingen diagnostiskt läge (Dx) eller i läget som endast är för forskningsändamål (RUO). *In vitro*-analyser med diagnostisk sekvensering, inklusive modulen Germline Variant (könsellsvariant) och modulen Somatic Variant (somatisk variant), utförs i det diagnostiska läget. Endast IVD-sekvenseringsreagenser kan användas i det diagnostiska läget. Prestandaegenskaper och procedurbegränsningar för NextSeq 550Dx-instrumentet har fastställts med hjälp av modulen Germline Variant (könsellsvariant) och modulen Somatic Variant (somatisk variant) i diagnostiskt läge.

Begränsningar

1. För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
2. Modulen Germline Variant (könscellsvariant) och modulen Somatic Variant (somatisk variant) kan när de används med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) leverera
 - utdata från sekvensering ≥ 90 gigabaser (Gb)
 - läsningens längd (i paired end-körning) 2 x 150 baspar (bp)
 - baser större än eller lika med Q30 ≥ 75 % vid läsningens längd på 2 x 150 bp.
75 % eller fler av baserna har Phred-kvalitetspoäng ≥ 30 , vilket indikerar att basbestämningens noggrannhet överstiger 99,9 %.
3. Läsningar med indels (insertioner, deletioner eller kombinationer) vars innehållslängd är > 25 bp passas inte in av analysprogrammet. Det innebär att indels med en längd på > 25 bp inte detekteras av analysprogrammet.
4. Analysprogrammet passar kanske inte in ampliconläsningar med extremt variantinnehåll, vilket medför att området rapporteras som vildtyp. Här följer några exempel på sådant extremt innehåll:
 - läsningar som innehåller fler än tre indels
 - Läsningar med en längd på minst 30 bp med ett SNV-innehåll (enkelnukleotidvariant) på > 4 % av den totala ampliconmålslängden (exklusive sondområden)
 - Läsningar med en längd på < 30 bp med ett SNV-innehåll på > 10 % av den totala ampliconlängden (inklusive sondområden)
5. Större varianter, som multinukleotidvarianter (MNV) och större indels, kan komma att rapporteras som separata mindre varianter i VCF-utdatafilen.
6. Deletionsvarianter kan filtreras eller missas när de sträcker sig över två överlappande ampliconer om deletionens längd är större än eller lika med överlappningen mellan ampliconerna.
7. Systemet kan inte detektera indels om de angränsar direkt till en primer och det inte finns någon överlappande amplicon. För områden med överlappande ampliconer kan analysen inte detektera deletioner när området med överlappningen är mindre än den deletion som ska detekteras. Om exempelvis det överlappande området mellan två intilliggande ampliconer är två baser kan analysen inte detektera några deletioner som inkluderar båda de två baserna. En enbas-deletion vid endera av baserna kan detekteras.
8. Liksom med alla hybridiseringsbaserade arbetsflöden för beredning av bibliotek kan underliggande polymorfismer, mutationer, insertioner eller deletioner i oligonukleotidbindande regioner påverka de alleler som undersöks och de bestämningar som görs under sekvensering. Här följer några exempel:
 - En variant i fas med en variant i primerregionen amplifieras eventuellt inte, vilket ger ett falskt negativt resultat.
 - Varianter i primerregionen kan förhindra amplifiering av referensallelen, vilket medför en felaktig homozygot variantbestämning.

- Indelvarianter i primerregionen kan orsaka en falsk positiv bestämning i slutet av läsningen bredvid primern.
9. Indels kan filtreras på grund av strängbias om de finns nära slutet på en läsning och mjukklippas under inpassning.
 10. Små MNV:er har inte validerats och rapporteras enbart i modulen Somatic Variant (Somatisk variant).
 11. Deletioner rapporteras i VCF-filen vid den föregående basens koordinat enligt VCF-formatet. Därför bör angränsande varianter övervägas innan en enskild basbestämning rapporteras som en homozygot referens.
 12. Könslinjespecifika begränsningar:
 - NextSeq 550Dx-instrument tillsammans med Local Run Managers modul Germline Variant (könsceellsvariant) för NextSeq 550Dx, är utformat för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av könsceellsvarianter (t.ex. homozygot, heterozygot eller vildtyp).
 - Vid användning med modulen Germline Variant (könsceellsvariant) krävs en minsta täckning per amplikon på 150x för korrekt variantbestämning. Därmed krävs 150 stödjande DNA-fragment, vilket motsvarar 300 överlappande paired-end-läsningar. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
 - Variation i antal kopior kan påverka om en variant identifieras som homozygot eller heterozygot.
 - Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. För bestämning av könsceellsvarianter krävs minst nio upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras. Endast upprepningar med en längd på upp till 5 bp beaktas (R5 x 9).
 - En indel och en SNV i ett och samma locus kan leda till endast en variant som rapporteras.
 13. Begränsningarna nedan gäller specifikt för Somatic.
 - NextSeq 550Dx-instrument tillsammans med Local Run Managers modul Somatic Variant (somatisk variant) för NextSeq 550Dx är utformat för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av somatiska varianter (t.ex. bestämning av en somatisk variant med en variantfrekvens som är större än eller lika med 0,026 med en detektionsgräns på 0,05).
 - Vid användning med modulen Somatic Variant (somatisk variant) krävs en minsta täckning per amplikon på 450 x per oligonukleotidpool för korrekt variantbestämning. Därmed krävs 450 stödjande DNA-fragment per oligonukleotidpool, vilket motsvarar 900 överlappande paired-end-läsningar. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
 - För bestämning av somatiska varianter krävs minst sex upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras och endast upprepningar med en längd på upp till 3 bp beaktas (R3 x 6).
 - Modulen Somatic Variant (somatisk variant) kan inte skilja mellan könsceellsvarianter och somatiska varianter. Modulen är utformad för att detektera varianter med ett antal olika variantfrekvenser, men variantfrekvens kan inte användas för att skilja mellan somatiska varianter och könsceellsvarianter.

- Normal vävnad i provet påverkar detekteringen av varianter. Den rapporterade detekteringsgränsen baseras på en variantfrekvens som förhåller sig till det totala DNA som extraheras från både tumörvävnad och normal vävnad.

Produktkomponenter

Illumina NextSeq 550Dx består av följande:

1. NextSeq 550Dx-instrument (katalognr 20005715)
2. Programvarukomponenter för NextSeq 550Dx-instrument inkluderar följande:

Programvara	Funktion	Beskrivning
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Styr drift av instrumentet	Programvaran NOS styr instrumentets drift under sekvensering och genererar bilder som används av programvaran Real-Time Analysis (RTA).
Real-time Analysis Software (RTA)	Utför primär analys	RTA-programvaran konverterar bilderna som genereras av NOS för varje ruta per cykel av sekvenseringskörningen till basbestämningsfiler, som utgör indata för analysmodulerna i Local Run Manager. Programvaran RTA innehåller inget användargränssnitt.
Local Run Manager	Gränssnitt för val av modul.	Programvaran Local Run Manager är en integrerad lösning i instrument för användarhantering, val av lämplig analysmodul och statusövervakning.
Modulen Somatic Variant (somatisk variant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Local Run Manager, genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexering, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Pisces) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom, inklusive uppmätt variantfrekvens.
Modulen Germline Variant (köns-cellsvariant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Local Run Manager, genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexering, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Pisces) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom och identifierar varje variant som heterozygot eller homozygot.

3. **Tillval** Illumina DRAGEN-server för NextSeq 550Dx (katalognr 20086130), inklusive följande programvarukomponent:

Programvara	Funktion	Beskrivning
Illumina Run Manager	Gränssnitt för val av applikationsmodul	Illumina Run Manager-programvaran installeras på tillvalet DRAGEN-servern vid sidan av instrumentet. Illumina Run Manager möjliggör användarhantering, val av analysmodul och övervakning av sekvenseringskörning och analysstatus.

Den valfria Illumina DRAGEN Server för NextSeq 550Dx är endast tillgängligt i utvalda länder. Kontakta en Illumina-representant angående regional tillgänglighet.

Driftförhållanden

Mer information om driftförhållanden finns i avsnittet Miljöfaktorer att beakta i *Förberedelseguide för NextSeq 550Dx-instrumentets plats (dokumentnr 1000000009869)*.

Element	Specifikation
Temperatur	Bibehåll en temperatur på 19 °C till 25 °C (22 °C ± 3 °C) i laboratoriet. Den här temperaturen är instrumentets drifttemperatur. Under en körning får omgivningstemperaturen inte variera med mer än ±2 °C.
Luftfuktighet	Bibehåll en icke-kondenserande relativ luftfuktighet på 20–80 %.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning och nödvändigt material som säljs separat

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

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler), katalognr 20028871

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Förbrukningsmaterial för sekvenseringskörning som tillhandahålls av användaren

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
Alkoholservetter, 70 % isopropyl eller etanol, 70 %	VWR, katalognr 95041-714 (eller motsvarande) Valfri leverantör av laborieutrustning	Rengöring av flödescell samt allmänna ändamål

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
Servett för laboratoriebruk, luddfri	VWR, katalognr 21905-026 (eller motsvarande)	Rengöring av flödescell samt allmänna ändamål

Förbrukningsmaterial för instrumentunderhåll som tillhandahålls av användaren

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
NaOCl, 5 % (natriumhypoklorit)	Sigma-Aldrich, katalognr 239305 (eller motsvarande laboratorieklass)	Rengöring av instrumentet med hjälp av manuell tvätt efter en körning, spädd till 0,12%
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalognr P7949	Rengöring av instrumentet med hjälp av alternativ för manuell tvätt, spädd till 0,05 %
Vatten av laboratoriekvalitet	Valfri leverantör av laborieutrustning	Tvätt av instrument (manuell tvätt)
Luftfilter	Illumina, katalognr 20063988	Rengöring av luften som instrumentet tar in för kylning

Riktlinjer för vatten av laboratoriekvalitet

Använd alltid vatten av laboratoriekvalitet eller avjoniserat vatten för att utföra instrumentprocedurer. Använd aldrig kranvatten. Använd endast vatten av följande eller likvärdig kvalitet:

- avjoniserat vatten
- Illumina PW1
- 18 Megaohm (MΩ) vatten
- Milli-Q-vatten
- Super-Q-vatten
- vatten av molekylärbiologisk kvalitet

Varningar och försiktighetsåtgärder



FÖRSIKTIGHET

Enligt federal lag i USA får denna produkt endast säljas av eller på ordination av läkare eller övrig vårdpersonal som har licens i den delstat där han/hon är verksam och får använda eller ordinera användning av produkten.

1. **Vissa komponenter i reagenser som tillhandahålls av Illumina för användning tillsammans med NextSeq 550Dx-instrument kan innehålla farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.**
2. Rapportera omedelbart allvarliga händelser relaterade till den här produkten till Illumina och behöriga myndigheter i det land där användaren och patienten befinner sig.
3. Hantera alla blodprover som om de konstaterats bära på humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
4. Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra provkvaliteten.
5. Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenssatser. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenssatser.
6. God laboratoriesed och laboratoriehygien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagens, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontaminering kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
7. Områdena som används före och efter amplifiering ska ha egen utrustning och eget förbrukningsmaterial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, värmeblock, vortexblandare och centrifuger) för att undvika kontaminering.
8. Index för parade prover måste matcha den tryckta plattlayouten exakt. Local Run Manager fyller automatiskt i de indexprimrar som förknippas med provnamnen när de anges i modulen. Användaren rekommenderas att verifiera indexprimrarna associerade med proverna innan sekvenseringskörningen påbörjas. Bristande överensstämmelse mellan proverna och plattlayout leder till förlust av positiv providentifikation och felaktig rapportering av resultat.
9. Installation av antivirusprogram som användaren själv tillhandahåller rekommenderas starkt för att skydda datorn mot virus. Se användarhandboken för anvisningar om installation.
10. Använd inte NextSeq 550Dx med någon av panelerna borttagen. Om instrumentet används när en eller flera paneler är borttagna finns det risk för potentiell exponering för systemspänning och likspänning.
11. Rör inte vid flödescellsplattformen i flödescellsfacket. Värmaren i det här facket har en temperatur mellan 22 °C och 95 °C och kan orsaka brännskador.
12. Instrumentet väger cirka 185 lbs och kan orsaka allvarliga personskador om det tappas eller hanteras på fel sätt.

Bruksanvisning

Följande bruksanvisning för användning av NextSeq 550Dx-instrument kräver reagenser som medföljer NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cykler).

Skapa körning

Skapa en sekvenseringskörning med Local Run Manager eller Illumina Run Manager. Instruktioner för användning av Local Run Manager finns nedan och i Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513). För instruktioner om hur du skapar en körning med Illumina Run Manager, se Illumina Run Manager för NextSeq 550Dx programvaruguide (dokumentnr 200025239).

Anvisningar om hur du väljer mellan Local Run Manager eller Illumina Run Manager finns i Illumina Run Manager för NextSeq 550Dx programvaruguide (dokumentnr 200025239). Detaljerade instruktioner om specifika program finns i modulen eller programguiden för den specifika analysen.

Följande instruktioner gäller användning av modulerna Germline Variant (könsellsvariant) och Somatic Variant (somatisk variant) i Local Run Manager.

Ställa in parametrar

1. Logga in i Local Run Manager.
2. Välj **Create Run** (skapa körning) och välj **Somatic Variant** (Somatisk variant) eller **Germline Variant** (könsellsvariant).
3. Ange ett namn på körningen som identifierar körningen från sekvensering till analys. Använd alfanumeriska tecken, blanksteg, understreck eller bindestreck.
4. [Valfritt] Ange en beskrivning av körningen som hjälper till att identifiera körningen. Använd alfanumeriska tecken, blanksteg, understreck eller bindestreck.
5. Välj antal prover och indexset i listrutan.
Överväg följande information när du väljer ett alternativ.
 - Listrutan visar antal prover med ett indexset. Till exempel anger "24-Set 1" att 24 prover ska testas, med index från indexset 1.
 - Indexsetnumren hänvisar till olika set av i5- och i7-indexpar. Set 1 och Set 2 ger båda indexmångfald. Två indexset erbjuds för att förhindra att ett enda set förbrukas.
 - Välj antalet prover som är närmast det antal prov du testas. Om det exakta antalet prov inte finns med i listan väljer du det närmaste antalet som innehåller färre prover än det antal som testas. Om du exempelvis vill testa 18 prover väljer du 16 prover.
 - Föreslagna provbrunnar och indexkombinationer som uppfyller kraven för indexmångfaldskrav är markerade med grönt.

Importerera manifestfiler för körningen

1. Kontrollera att de manifest du vill importera finns på en åtkomlig plats i nätverket eller på en USB enhet.
2. Välj **Import Manifests** (Importerera manifest).
3. Navigera till manifestfilen och välj de manifest som du vill lägga till.

OBS! Lägg till manifesten via funktionen Module Settings (modulinställningar) för att göra manifestfilerna tillgängliga för alla körningar med analysmodulen Germline Variant (könscellsvariant) eller Somatic Variant (somatisk variant). Den här funktionen kräver behörighet på administratörsnivå. För mer information, se *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.


Ange prover för körningen

Ange prover för körningen med hjälp av ett av alternativen och anvisningarna som följer.

Enter samples manually (Ange prover manuellt) – använd den tomma tabellen på skärmen Create Run (Skapa körning).


Import samples (Importerera prover) – navigera till en extern fil i ett format med kommateckenavgränsade värden (*.csv). En mall kan hämtas på skärmen Create Run (Skapa körning).

Ange prover manuellt

1. Ange ett unikt provnamn (*analysmodulen Somatic Variant*) eller prov-ID (*analysmodulen Germline Variant*). Använd alfanumeriska tecken, bindestreck eller understreck.
2. [Valfritt] Högerklicka och välj kontrolltyp för positiva eller negativa kontrollprover. Kontrollen i en provbrunn fylls automatisk i motsvarande brunn i den andra poolen med samma kontroll.
3. [Valfritt] Ange en beskrivning av provet i fältet Sample Description (Beskrivning av provet). Använd alfanumeriska tecken, bindestreck eller understreck.
4. Välj en Index 1-adapter i listrutan Index 1 (i7).
Om du använder de föreslagna provbrunnarna fyller programvaran automatiskt i i7- och i5-indexadapterar som uppfyller mångfaldskraven för index. Om det exakta antalet prover du testat inte finns med i listan måste du komma ihåg att välja indexadapterar för extra brunnar.
5. Välj en Index 2-adapter i listrutan Index 2 (i5).
6. Välj en manifestfil i listrutan Manifest.
Proverna i uppsättning A måste ha ett annat manifest än proverna i uppsättning B.
7. Välj ett alternativ för att visa, skriva ut eller spara plattlayouten som referens för beredning av bibliotek:
 - Klicka på ikonen  **Print** (Skriv ut) för att visa plattlayouten. Välj **Print** (Skriv ut) för att skriva ut plattlayouten.
 - Klicka på **Export** (Exportera) för att exportera provinformation till en extern fil.

8. Välj **Save Run** (Spara körning).

Importera prover

1. Välj **Import Samples** (Importera prover) och bläddra till platsen där filen med provinformation finns. Två typer av filer kan importeras.
 - Klicka på **Template** (Mall) på skärmen Create Run (Skapa körning) för att skapa en ny plattlayout. Mallfilen innehåller rätt kolumnrubriker för import. Ange provinformation i varje kolumn för proverna i körningen. Ta bort exempelinformation i oanvända celler och spara sedan filen.
 - Använd en fil med provinformation som exporterats från modulen Germline Variant (könsellsvariant) eller modulen Somatic Variant (somatisk variant) med exportfunktionen.
2. Klicka på ikonen  **Print** (Skriv ut) för att visa plattlayouten.
3. Välj **Print** (Skriv ut) för att skriva ut plattlayouten som referens vid bibliotekberedning.
4. Välj **Save Run** (Spara körning).

Bereda reagenskassetten

Följ anvisningarna för reagenskassetten noga för att uppnå en lyckad sekvensering.

1. Ta fram reagenskassetten från förvaringen vid -25 °C till -15 °C.
2. Välj en av metoderna nedan för att tina upp reagenserna. Sänk inte ned hela kassetten i någon vätska. När kassetten har tinat ska den torkas torr före nästa steg.

Temperatur	Tid för upptining	Stabilitetsgräns
Vattenbad, 15 °C till 30 °C	60 minuter	Får inte överskrida 6 timmar
2 °C till 8 °C	7 timmar	Får inte överskrida 5 dagar

OBS! Om fler än en kassett tinas upp i samma vattenbad ska tiden för upptining förlängas.

3. Blanda reagenserna genom att vända på kassetten fem gånger.
4. Kontrollera kassetten botten för att säkerställa att reagenserna är tinade och fria från fällningar. Kontrollera att positionerna 29, 30, 31 och 32 är tinade eftersom de är störst och tar längst tid att tina.
5. Knacka försiktigt kassetten i bänken för att minska mängden luftbubblor.
För bästa resultat ska du direkt gå vidare till att ladda provet och förbereda körningen.

Förbereda flödescellen

1. Hämta en ny flödescellsförpackning från platsen där den har förvarats i 2 °C till 8 °C.
2. Ta bort foliepaketet från lådan och lägg åt sidan i rumstemperatur i 30 minuter.

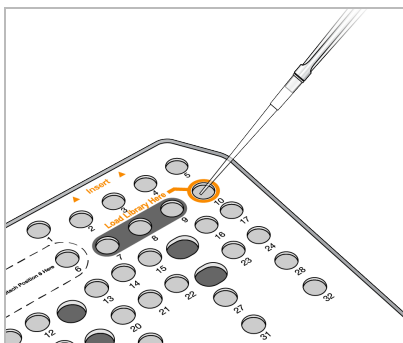
Förbereda bibliotek för sekvensering

Denaturera och späd biblioteken till en laddningsvolym på 1,3 ml. I praktiken kan laddningskoncentrationen variera beroende på vilka metoder för beredning av bibliotek och kvantifiering som används. Spädningen av provbibliotek beror på oligonukleotidpoolernas komplexitet. Anvisningar för beredning av provbibliotek för sekvensering, inklusive spädning och pooling av bibliotek, finns i bruksanvisningens avsnitt om den aktuella biblioteksprepareringssatsen. Optimering av klustertäthet i NextSeq 550Dx krävs.

Ladda bibliotek på reagenskassetten

1. Rengör folieförseglingen som täcker behållare 10 och är märkt med **Load Library Here** (Ladda bibliotek här) med en luddfri servett.
2. Stick hål på förseglingen med en ren 1 ml pipettspets.
3. Ladda 1,3 ml förberedda bibliotek i behållare 10 som är märkt med **Load Library Here** (Ladda bibliotek här). Undvik att vidröra folieförseglingen vid dispensering av biblioteken.

Figur 1 Ladda bibliotek



Ställa in en sekvenseringskörning

Se Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513) för fullständiga anvisningar för konfiguration.

1. Logga in i NextSeq 550Dx med ditt lösenord till programvaran Local Run Manager eller Illumina Run Manager.
2. Välj **Sequence** (Sekvens) på startskärmen i NOS-programvaran.
3. Välj en körning ur listan och välj sedan **Next** (Nästa).

En serie körningskonfigurationsskärmar öppnas i följande ordning: Load Flow Cell (Ladda flödescell), Load Buffer Cartridge (Ladda buffertkasset), Load Reagent Cartridge (Ladda reagenskasset) och Pre-run Check (Förkörningskontroll).

OBS! Körningar är endast tillgängliga med samma Run Manager som användes vid planeringen av körningen. Anvisningar om hur Run Manager-programvaran ska konfigureras finns i Illumina Run Manager för NextSeq 550Dx programvaruguide (dokumentnr 200025239).

4. Gör rent och ladda sedan flödescellen när skärmen Load Flow Cell (Ladda flödescell) visas.
 - Ta ut flödescellen ur folieförpackningen.
 - Öppna den genomskinliga blisterförpackningen i plast och ta ut flödescellen
 - Rengör flödescellens glasyta med en luddfri alkoholservett. Torka glasytan torr med en luddfri laboratorietrasa
 - Kontrollera att flödescellens glasyta är ren. Upprepa rengöringssteget vid behov.
 - Ta ut den använda flödescellen från en tidigare körning.
 - Passa in flödescellen över inpassningsstiften och placera flödescellen på plattformen.
5. Välj **Load** (Ladda).
Luckan stängs automatiskt, flödescellens ID visas på skärmen och sensorerna kontrolleras.
6. Följ programvarans uppmaningar för att tömma behållaren med förbrukade reagens, ladda NextSeq 550Dx-buffertkassetten och ladda NextSeq 550Dx-reagenskassetten.
Programvaran läser och registrerar RFID när NextSeq 550Dx-buffertkassetten och -reagenskassetten har laddats. Buffert- och reagenskassetternas respektive ID visas på skärmen och sensorerna kontrolleras.
7. Välj **Start** (Starta) när den automatiska kontrollen före körning har slutförts. (Krävs inte om automatisk start har konfigurerats.)
8. Skärmen Sequencing (Sekvensering) öppnas när körningen påbörjas. Skärmen ger en visuell framställning av den pågående körningen, inklusive intensiteter och kvalitetspoäng (Q-resultat).

Resultat

Programvaran Real-Time Analysis (RTA) är en integrerad programvara som utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar en kvalitetspoäng till varje bas för varje sekvenseringscykel. När den primära analysen avslutats startar den valda programmodulen automatiskt den sekundära analysen. De sekundära analysprocesser som beskrivs här gäller för Local Run Manager modulen Germline Variant (könscellsvariant) och modulen Somatic Variant (somatisk variant) på NextSeq 550Dx-instrument.

Demultiplexering

Vid demultiplexering jämförs varje indexavläsningssekvens med de indexsekvenser som har angetts för körningen. Inga kvalitetsvärden beaktas i det här steget.

Indexavläsningar identifieras med följande steg:

- Proverna numreras i den ordning som de anges för körningen, med början på 1.

- Provnummer 0 är reserverat för kluster som inte tilldelats till något prov.
- Klustren tilldelas till ett prov när indexsekvensen matchar exakt eller när det finns högst en enskild felparning per indexavläsning.

Generering av FASTQ-filer

Efter demultiplexeringen genererar programvaran intermediära analysfiler i FASTQ-format, vilket är ett textformat som används för att representera sekvenser. FASTQ-filer innehåller avläsningar för varje prov och tillhörande kvalitetspoäng. Kluster som inte passerat filtret utesluts.

Varje FASTQ-fil innehåller endast avläsningar för ett prov och namnet på det provet ingår i FASTQ-filens namn. I modulerna Germline Variant (könsellsvariant) och Somatic Variant (somatisk variant) genereras åtta FASTQ-filer per prov per oligopool, fyra från Read 1 (avläsning 1) och fyra från Read 2 (avläsning 2). Denna utdata resulterar i totalt 8 och 16 FASTQ-filer per prov för Germline (könsell) respektive Somatic (somatisk). FASTQ-filer är inpassningens primära indata.

Inpassning

Under inpassningssteget passar Smith-Waterman-bandalgoritmen in kluster från varje prov mot ampikonsekvenser som specificerats i manifestfilen.

Smith-Waterman-bandalgoritmen utför semiglobala sekvensinpassningar för att fastställa liknande regioner mellan två sekvenser. Smith-Waterman-algoritmen jämför inte hela sekvensen utan jämför i stället segment av alla möjliga längder.

Varje paired end-avläsning utvärderas med avseende på dess inpassning till de relevanta sondsekvenserna för avläsningen.

- Avläsning 1 utvärderas mot det omvända komplementet hos nedströms lokusspecifika oligonukleotider (Downstream Locus-Specific Oligos – DLSO).
- Avläsning 2 utvärderas mot de uppströms lokusspecifika oligonukleotiderna (ULSO).
- Om början på en läsning matchar en sondsekvens med högst en felparning passas hela avläsningens längd in mot ampikonmålet för den sekvensen.
- Om början på en avläsning matchar en sondsekvens med högst tre skillnader (felparningar eller förskjutningar på grund av indels) passas hela avläsningens längd in mot ampikonmålet för den sekvensen.
- Indels inom DLSO och ULSO observeras inte på grund av analysmetoden.

Inpassningar filtreras från inpassningsresultat baserat på felparningsfrekvensen över antingen intresseområdet eller den fullständiga ampikonen, beroende på ampikonens längd. Filtrerade linjeringar anges som ej linjerade i linjeringsfiler och används inte vid variantbestämning.

Variantbestämning

Variantbestämningsprogrammet Pisces är utformat för att variantbestämma SNV:er och indels från bibliotek som har beretts för instrumentet.

Rapporter och andra utdatafiler

Analysmodulerna för varianter genererar rapporter i PDF-format och tabbavgränsat format (*.txt) med mätvärden som sekvenseringsdjup och variantantal. Modulerna genererar också utdatafiler som VCF- och gVCF-filer (format för genomvariantbestämning) för variantbestämningstillämpningar.

Kvalitetskontrollprocedurer

Programvaran NextSeq 550Dx utvärderar varje körning, prov och basbestämning mot kvalitetskontrollmått. Positiva och negativa kontroller rekommenderas också vid beredning av bibliotek och de behöver utvärderas. Utvärdera kontrollerna enligt anvisningarna nedan:

- **Negativ kontroll (kontroll utan mall) eller annan negativ kontroll** – måste generera det förväntade resultatet. Om den negativa kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från det förväntade kan det ha inträffat ett fel i provspårningen, en inkorrekt registrering av indexprimrar eller en förorening.
- **Positivt kontrollprov** – måste generera det förväntade resultatet. Om den positiva kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från det förväntade kan det ha inträffat ett fel i provspårningen eller en inkorrekt registrering av indexprimrar.

Prestandaegenskaper

Prestandaegenskaperna för NextSeq 550Dx-instrument fastställdes med hjälp av modulen Germline Variant (könsceallsvariant) och modulen Somatic Variant (somatisk variant) med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och bekräftades med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Studierna omfattade provindexering, provöverföring, DNA-inmatning, analytisk sensitivitet (gräns för blankprov/detekteringsgräns), noggrannhet, precision, metodjämförelse och reproducerbarhet.

De analytiska studierna med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) utformades för att utvärdera prestandakrav som tidigare fastställdes med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler). Resultaten visar att reagenskitten (v2 och v2.5) har jämförbara prestanda med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. I *bipacksedeln till TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* finns mer information om prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer som extraktionsmetoder eller interfererande substanser.

Definitioner av beräkningar som används för prestandaegenskaper

1. Positiv procentuell överensstämmelse (PPA) beräknas som andelen loci som klassificeras som varianter med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal variantloci})$
Variantloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant positiva resultat (TP). Variantloci som rapporteras som referensbestämningar eller som andra variantbestämningar i analysen är falskt negativa resultat (FN).
2. Negativ procentuell överensstämmelse (NPA) beräknas som andelen loci som klassificeras som vildtyp med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal vildtypsloci})$
Vildtypsloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant negativa resultat (NP). Vildtypsloci som rapporteras som varianter i analysen är falskt positiva resultat (FP).
3. Total procentuell överensstämmelse (OPA) beräknas som andelen loci som rapporteras korrekt i analysen i förhållande till en referensmetod.
 - $((\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) + (\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen})) / ((\text{totalt antal variantloci}) + (\text{totalt antal vildtypsloci}))$
4. Beräkningarna av PPA, NPA och OPA innefattar inte saknade bestämningar (variant- eller referensloci som inte uppfyller kriterierna i ett eller flera kvalitetsfilter).
5. Autosomal bestämningsfrekvens beräknas som totalt antal loci som passerar filtren, delat med totalt antal positioner som sekvenseras för kromosomerna 1–22. Kromosom X och Y ingår inte. Det här värdet tar inte hänsyn till bestämnings överensstämmelse med referensmetoden.

Prestanda för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler)

Provindexering

Provindexering som läggs till under biblioteksberedning ger varje prov-DNA en unik sekvens. Med de unika sekvenserna kan flera prover poolas i en och samma sekvenseringskörning. Provindexering används för både könscell och somatiska arbetsflöden. Syftet med denna studie var att fastställa det minsta (8) och maximala (96) antalet prover som kan bearbetas i en enda sekvensering som körs av NextSeq 550Dx-instrument. Åtta unika Platinum Genome-prover testades med 12 olika indexprimerkombinationer per prov. Provresultat från fyra sekvenseringskörningar med modulen Germline Variant (könscellsvariant) jämfördes med Platinum Genome-versionen 2016-1.0.

I den första omgången körningar testades 96 unikt indexerade provbibliotek med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser per sträng i alla 23 humana kromosomer, i avsikt att verifiera analysens förmåga att konsekvent genotypbestämma ett givet prov med olika indexprimerkombinationer. I den andra omgången körningar sekvenserades åtta unikt indexerade provbibliotek i två sekvenseringskörningar för att fastställa det minsta antalet index som stöds.

För 96-indexkörningarna varierade PPA för SNV:er mellan 98,7 % och 100 %, PPA för insertioner och deletioner var 100 % och NPA var 100 % för var och en av de 96 indexkombinationerna. 8-indexkörningarna hade PPA-värden på 100 % (SNV:er, insertioner och deletioner) och NPA-värden på 100 % för var och en av de åtta indexkombinationerna.

Provöverföring

NextSeq 550Dx-instrumentet möjliggör sekvensering av flera prover och kontroller i en och samma sekvenseringskörning. En studie genomfördes för att utvärdera omfattningen av provöverföring inom en sekvenseringskörning (inom körning) och mellan sekvenseringskörningar (mellan körningar). Två Platinum Genome-prover, ett från en man och ett från en kvinna, testades med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser (150 amplikoner) i 23 olika kromosomer, inklusive båda könskromosomerna. Bibliotek sekvenserades i NextSeq 550Dx-instrumentet med hjälp av modulen Germline Variant (könscecellvariant). Överföring av prover från män till prover från kvinnor observerades genom förekomsten av amplikonläsningar med Y-kromosomer i prover från kvinnor.

Överföring inom körningar kan uppstå under generering av kluster, basbestämning i indexcykeln och provdemultiplexering. En bibliotekspool bestående av 46 replikat vardera av prover från män och prover från kvinnor samt fyra reagenskontroller utan mall sekvenserades en gång i NextSeq 550Dx-instrumentet för att testa provöverföringen inom en sekvenseringskörning. Provöverföringen inom körningen analyserades genom att jämföra amplikontäckningen med Y-kromosomer för varje replikat från kvinnor med den genomsnittliga amplikontäckningen med Y-kromosomer för alla replikat från män i poolen. Det observerade medianvärdet för överföring inom en körning var 0,084 %.

Två bibliotekspooler bereddes och sekvenserades i följd i ett NextSeq 550Dx-instrument för att testa provöverföringen mellan körningar. Den första poolen innehöll 46 replikat av prov från kvinna samt två reagenskontroller utan mall. Den andra poolen innehöll 46 replikat av prov från man samt två reagenskontroller utan mall. Båda poolerna använde samma uppsättning indexadapterar. Poolen med replikat från kvinna sekvenserades först, följt av en sekvenseringskörning av poolen med replikat från man, följt av en upprepad sekvenseringskörning av poolen med replikat från kvinna. Provöverföringen mellan körningar analyserades genom att jämföra amplikontäckningen med Y-kromosomer mellan replikat från den upprepade körningen av poolen med replikat från kvinna och motsvarande replikat från körningen av poolen med replikat från man. Det observerade medianvärdet för överföring mellan körningar var 0,0076 %.

DNA-inmatning

Blod (könscecell)

Inmatningsintervallet för blod-DNA för biblioteksberedning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och med hjälp av arbetsflödet i modulen Germline Variant (könscellsvariant) har etablerats för NextSeq 550Dx-instrument. Intervallet utvärderades genom en seriespänningsstudie med 13 Platinum Genome-prover och med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Biblioteket sekvenserades i två NextSeq 550Dx-instrument med ett parti av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler).

Fem prover testades i duplikat vid fem DNA-inmatningsnivåer från 250 ng till 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng och 12 ng). Åtta prover testades i ett enda replikat vid vardera av de fem DNA-inmatningsnivåerna. För bestämning av noggrannhet jämfördes provgenotyper med Platinum Genomes version 2016-1.0. Resultaten fastställdes för varje inmatningsnivå. PPA för varje varianttyp (SNV:er, insertioner och deletioner) presenteras i [Tabell 1](#). NPA presenteras i [Tabell 2](#). Alla inmatningsnivåer hade liknande noggrannhet. Den rekommenderade DNA-inmatningen för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx är 50 ng, med 25 ng och 100 ng som undre respektive övre gräns för att motsvara prestandaegenskaperna.

Tabell 1 PPA-resultat för varje DNA-inmatning, efter varianttyp

DNA-inmatning (ng)	Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)
12	SNV	2 412	2 381	31	0	98,7
25			2 404	8	0	99,7
50			2 403	9	0	99,6
100			2 412	0	0	100
250			2 412	0	0	100
12	Insertion	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Deletion	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabell 2 NPA för varje DNA-inmatning

DNA-inmatning (ng)	TN	FP	Saknade referensbestämningar	NPA (%)
12	430 940	4	26	>99,9

25	430 936	0	34	100
50	430 936	2	32	>99,9
100	430 942	0	28	100
250	430 942	0	28	100

FFPE (somatisk)

Inmatningsintervallet för formalinfixerat, paraffininbäddat (FFPE) DNA för biblioteksberedning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och med hjälp av arbetsflödet i modulen Somatic Variant (somatisk variant) har etablerats för NextSeq 550Dx-instrumentet. DNA-inmatningsintervallet utvärderades genom en seriespänningsstudie med tre Platinum Genome-prover och en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin, följt av DNA-extraktion. GM12878 späddes med GM12877 så att variantallelfrekvenserna (VAF) för 79 varianter (55 SNV:er, 9 insertioner och 15 deletioner) låg nära 0,025, 0,05 eller 0,10. Dessutom hade varje prov 91 varianter med högre variantfrekvenser på upp till 1,0 VAF. Proverna bearbetades i duplikat vid fem DNA-inmatningsnivåer med en genomsnittlig delta-kvantitativ cykel (dCq) på 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 och 7,8, uppmätt med TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Varje bibliotek sekvenserades i två NextSeq 550Dx-instrument med två partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler). För bestämning av noggrannhet jämfördes provvariantbestämning med Platinum Genomes version 2016-1.0. PPA för varje varianttyp (SNV:er, insertioner och deletioner) presenteras i [Tabell 3](#). NPA presenteras i [Tabell 4](#). Den rekommenderade DNA-inmatningen för varianterna vid 0,05 VAF eller högre är $dCq \leq 4$, med 4,6 som undre gräns för att motsvara prestandaegenskaperna.

Tabell 3 PPA-resultat för varje DNA-inmatning, efter varianttyp

Medelvärde för dCq	Variant-typ	Förväntade varianter	Förväntade saknade bestämningar	Målspädningens VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Saknade variantbestämningar	PPA (%)	Saknade variantbestämningar	PPA (%)	Saknade variantbestämningar	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ej tillämplig.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100

2,1	Insertion	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Deletion	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabell 4 NPA för varje DNA-inmatning

Medelvärde för dCq	Förväntad vildtyp	Målspädningens VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Saknade referensbestämningar	NPA (%)	Saknade referensbestämningar	NPA (%)	Saknade referensbestämningar	NPA (%)
2,1	93 688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1 308	100	1 336	100	784	100
6,0		3 900	>99,9	3 296	>99,9	2 996	100
7,8		3 020	>99,9	2 880	>99,9	2 448	>99,9

Analytisk känslighet (gräns för blankprov [LoB] och detekteringsgräns [LoD])

Den här studien genomfördes för att utvärdera gränsen för blankprov (LoB) och detekteringsgränsen (LoD) för modulen Somatic Variant (somatisk variant) på NextSeq 550Dx-instrumentet. Det gjordes med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin, följt av DNA-extraktion. GM12878 späddes ut med GM12877 så att variantfrekvenserna för 74 varianter (53 SNV:er, sju insertioner och 14 deletioner) var $0,05 \pm 0,02$. GM12877 och utspädd GM12878 (GM12878-D) testades under sex på varandra följande startdagar med ett enskilt instrument och alternerande mellan två partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) i totalt sex sekvenseringskörningar. Det här testet resulterade i 60 replikat för varje variant i GM12878-D och 72 replikat för varje motsvarande vildtypskoordinat i GM12877 för vardera reagensparti. LoB och LoD beräknades med hjälp av den klassiska metoden som anges i CLSI EP17-A2, med det icke-parametriska alternativet. LoB och LoD beräknades för SNV:er, insertioner och deletioner separat genom pooling av variantfrekvenserna för en given varianttyp. Typ I-fel definierades som 0,01 och typ II-fel definierades som 0,05.

För LoB sorterades de poolade variantfrekvenserna från lägsta till högsta och den 99:e i ordningen för varje reagensparti, för varje varianttyp, beräknades (Tabell 5). Modulen Somatic Variant (somatisk variant) använder en cutoff (effektiv LoB) på 0,026 VAF för bestämning av den kvalitativa detekteringen av varianter. Beräknad LoB bekräftade att den här cutoff-frekvensen gav ett typ I-fel på högst 0,01.

Tabell 5 Gräns för blankprov

Varianttyp	Totalt antal observationer	LoB för reagensparti 1 (%)	LoB för reagensparti 2 (%)
SNV	3 816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Deletion	1 008	1,20	1,20

För LoD beräknades hur stor procentandel av den enskilda mutationsfrekvensen för varje reagensparti, för varje varianttyp, som låg under cutoff på 0,026 (Tabell 6). Eftersom procentandelarna var lägre än typ II-felet på 5 % (0,05) beräknades medianvärdet för de kombinerade variantfrekvenserna som LoD (Tabell 6). LoD för varje varianttyp fastställdes som det större av de två värden som beräknats för de två reagenspartierna, 4,97 % för SNV:er, 5,12 % för insertioner och 5,26 % för deletioner.

Tabell 6 Detekteringsgräns

Reagensparti	Varianttyp	Totalt antal observationer	Antal VAF-mätningar < 2,6 %	% av VAF-mätningar < 2,6 %	Detekteringsgräns (%)
1	SNV	3 180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Deletion	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3 180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Deletion	840	7	0,80	5,26

Noggrannhet

Könsceller

Följande studie utfördes för att bedöma noggrannheten vid variantbestämning med modulen Germline Variant (könscellsvariant) i NextSeq 550Dx-instrument med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler). 13 unika Platinum Genome-prover testades med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser (150 ampliconer) i 23 olika kromosomer. Sammanlagt utfördes nio körningar med tre sekvenseringsinstrument, tre reagenspartier och tre operatörer under fem startdagar. Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med en väldefinierad och sammansatt referensmetod, Platinum Genome version 2016-1.0. Säkra genomregioner definierades utifrån den här referensmetoden om inget annat anges.

Tabell 7 Sammanfattning av överensstämmelse i Germline

Kriterier	Totalt antal observationer ¹	Resultat, efter observation ²	Resultat, efter körning ³
PPA för SNV	819	98,7	>99,9
PPA för insertioner	819	95,0	98,9
PPA för deletioner	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Beräknas som antalet prover per körning (91) x antal körningar (9) = 819.

²Lägsta observerade värde per provreplikant över alla nio körningar.

³Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

Tabell 8 innehåller studiedata som presenteras med positiv respektive negativ procentuell överensstämmelse per prov, där varianternas resultat jämförs med Platinum Genome version 2016-1.0 för beräkning av PPA. De tre varianttyperna (SNV, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 8 Överensstämmelse i Germline per prov

Prov	Genomsn. best.frekv.	Förväntade varianter ¹	TP	FN	Saknade variantbestämningar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4 788	4 788	0	0	756 762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8 505	8 379	1	125	751 464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6 048	5 985	5	58	757 701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6 993	6 930	0	63	757 638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7 875	7 811	3	61	751 653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6 300	6 174	3	123	754 803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7 119	7 056	0	63	751 905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7 182	7 119	6	57	754 146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7 686	7 560	2	124	754 173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7 245	7 182	7	56	752 469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7 119	7 119	0	0	750 645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6 804	6 804	0	0	756 065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7 434	7 371	1	62	750 015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Totalt antal varianter i alla provreplikant över nio körningar.

Tabell 9 innehåller studiedata som presenteras per prov, där varianternas resultat jämförs med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden. Detektering utvärderas för varje varianttyp separat – SNV:er, insertioner och deletioner. Referenspositioner ingår inte.

Tabell 9 Överensstämmelse i Germline per prov, efter varianttyp

Prov	SNV:er			Insertioner			Deletioner		
	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN
NA12877	2 331	2 331	0	1 323	1 323	0	1 134	1 134	0
NA12878	5 733	5 733	0	1 260	1 197	1	1 512	1 449	0
NA12879	3 591	3 591	0	1 323	1 260	5	1 134	1 134	0
NA12880	4 221	4 221	0	1 512	1 512	0	1 260	1 197	0
NA12881	4 914	4 913	1	1 512	1 449	2	1 449	1 449	0
NA12882	3 717	3 717	0	1 386	1 323	3	1 197	1 134	0
NA12883	4 284	4 284	0	1 449	1 449	0	1 386	1 323	0
NA12884	4 284	4 284	0	1 575	1 512	6	1 323	1 323	0
NA12885	4 725	4 725	0	1 575	1 512	2	1 386	1 323	0
NA12886	4 347	4 347	0	1 449	1 386	7	1 449	1 449	0
NA12887	4 284	4 284	0	1 323	1 323	0	1 512	1 512	0
NA12888	4 158	4 158	0	1 449	1 449	0	1 197	1 197	0
NA12893	4 599	4 599	0	1 386	1 323	1	1 449	1 449	0

Proverna analyserades vidare för att bestämma små insertioner och deletioner (indels). En övergripande sammanfattning presenteras i Tabell 10. Det fanns totalt 71 indels i storlekarna 1–24 bp för insertioner och 1–25 bp för deletioner.

Tabell 10 Sammanfattning av indeldetektering i Germline

Variant Typ	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA
Insertion	18 522	18 018	27	477	99,9
Deletion	17 388	17 073	0	315	100

Den representativa analysen bestod av 150 amplikoner utformade för att täcka olika genomiska innehåll. Amplikonernas GC-innehåll varierade från 0,19–0,87. Amplikonerna hade även en rad olika enkelnukleotid- (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Data sammanställdes per amplikon (Tabell 11) för att fastställa det genomiska innehålls effekt på procentandelen korrekta bestämningar. Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar.

Tabell 11 Noggrannhet på amplikonnivå i Germline

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76 167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	64 701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74 529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75 348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66 339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	57 330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	72 072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73 710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65 520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Ej tillämpligt	0,65	66 339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61 425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72 072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	71 253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	74 529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76 167	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	59 787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	74 823	0	1 344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ej tillämpligt	0,43	67 977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	57 330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	72 072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60 543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63 882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79 443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Ej tillämpligt	0,29	63 882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	50 778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56 511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	50 778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Ej tillämpligt	0,78	61 425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	68 796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Ej tillämpligt	0,39	52 416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	67 977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54 873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74 529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61 425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83 538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75 348	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	76 608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80 262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77 805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70 434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	76 986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74 529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Ej tillämpligt	0,44	59 787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72 072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	71 253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69 615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	73 710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	74 529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Ej tillämpligt	0,31	54 054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76 167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Ej tillämpligt	0,42	67 977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	72 171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54 873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80 262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53 235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Ej tillämpligt	0,49	78 624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67 977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	79 443	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	63 882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74 529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64 701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73 710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77 805	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	71 747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Ej tillämpligt	0,49	65 520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	66 339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Ej tillämpligt	0,45	78 624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57 330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Ej tillämpligt	0,65	81 900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50 778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Ej tillämpligt	0,59	83 538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59 787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Ej tillämpligt	0,42	69 615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74 529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69 615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	69 615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69 615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	68 796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	76 167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Ej tillämpligt	0,49	66 339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58 149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77 805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Ej tillämpligt	0,52	59 787	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	72 072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72 891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63 063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	54 873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Ej tillämpligt	0,25	67 977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	58 642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66 339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74 529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54 054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76 986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78 624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55 692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	76 167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77 805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58 149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Ej tillämpligt	0,36	74 529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57 330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Ej tillämpligt	0,27	51 597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77 805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71 253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85 176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	74 529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72 891	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	71 247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74 529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76 167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72 891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	66 343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74 529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	75 348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64 413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70 434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68 796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54 873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Ej tillämpligt	0,37	74 529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	56 511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	61 425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	66 339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	69 615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	53 235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	81 081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	60 605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	57 330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Ej tillämpligt	0,61	76 986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67 158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62 244	0	0	100

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	57 330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82 719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54 873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72 072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71 253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54 054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	80 262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	71 253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	0,32	56 439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73 710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81 900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Ej tillämpligt	0,68	79 443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79 443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Ej tillämpligt	0,6	81 081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75 348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56 511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56 511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Ej tillämpligt	0,52	58 149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt

Resultaten från sekvenseringen av prov NA12878 jämfördes med en mycket säker genotyp för NA12878 som etablerats av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2,19). Av de 150 ampliconerna låg 92 helt inom i de mycket säkra genomregionerna, 41 överlappade delvis och 17 ampliconer överlappade inte alls NIST-sekvensen. Det här resultatet gav 10 000 koordinater per replikat att jämföra. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Noggrannhetsresultaten visas i [Tabell 12](#).

Tabell 12 NA12878-provets överensstämmelse med NIST-databasen i Germline

Prov	Antal ampliconer	Genomsn. best.frekv.	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6 552	1	610 470	0	>99,9	100	>99,9

Baserat på data från denna könsstudie på nio körningar kan NextSeq 550Dx-instrument konsekvent sekvensera:

- GC-innehåll ≥ 19 % (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer med 19 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 0,6 % saknade bestämningar)
- GC-innehåll ≤ 87 % (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer med 87 % GC-innehåll bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- PolyA-längder ≤ 9 (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyA-upprepning med nio nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- PolyT-längder ≤ 10 (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyT-upprepning med tio nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- PolyG-längder ≤ 7 (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyG-upprepning med sju nukleotider bestämdes korrekt med 1,0 % saknade bestämningar)
- PolyC-längder ≤ 6 (alla bestämda baser i 2 457 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyC-upprepning med sex nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 11x$ (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 11x dinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 5x$ (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 5x trinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- Insertionslängder ≤ 24 (66 343 av 66 370 bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 24-nukleotidinsertion bestämdes korrekt med 1,2 % saknade bestämningar – inga felaktiga bestämningar inträffade i området innehållande 24-nukleotidinsertionen)
- Deletionslängder ≤ 25 (alla bestämda baser i 2 457 sekvenserade ampliconer innehållande en 25-nukleotiddeletion bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)

Somatisk

Studien som beskrivs här användes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Somatic Variant (somatisk variant) i NextSeq 550Dx-instrument med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler).

I studien användes en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser (150 ampliconer) i 23 olika kromosomer. Platinum Genome-DNA extraherades från FFPE-behandlade block för att generera sex unika prover för utvärdering i studien.

DNA från GM12877-provet späddes med DNA från GM12878-provet för att skapa GM12877-D5 och GM12877-D7 som en uppsättning unika heterozygota varianter med variantfrekvenser nära 5 % och 7 %. DNA från GM12878-provet späddes på liknande sätt med DNA från GM12877-provet för att skapa GM12878-D5 och GM12878-D7. Varje prov analyserades i triplikat med undantag för de spädda proverna som testades i sex replikat. Sammanlagt utfördes nio körningar med tre sekvenseringsinstrument, tre reagenspartier och tre operatörer under fem startdagar. Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden Platinum Genome version 2016-1.0. Säkra genomregioner definierades utifrån den här referensmetoden om inget annat anges.

Tabell 13 Sammanfattning av överensstämmelse i Somatic

Kriterier	Totalt antal observationer ¹	Resultat, efter observation ²	Resultat, efter körning ³
PPA för SNV	378	98,9	99,9
PPA för insertioner	378	96,9	99,9
PPA för deletioner	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Beräknas som antalet prover per körning (42) x antal körningar (9) = 378.

²Lägsta observerade värde per provreplikat över alla nio körningar.

³Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

Tabell 14 innehåller studiedata som presenteras med positiv respektive negativ procentuell överensstämmelse per prov, där varianternas resultat jämförs med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden för beräkning av PPA. De tre varianttyperna (SNV, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 14 Överensstämmelse i Somatic per prov

Prov	Genomsn. best.frekv.	Förväntad	TP	FN	Saknade variantbestämningar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2 052	2 025	0	27	318 682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3 645	3 564	0	81	317 645	0	100	100	100

Prov	Genomsn. best.frekv.	Förväntad	TP	FN	Saknade variantbestämningar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12879	99,8	2 592	2 538	0	54	323 614	2	100	>99,9	>99,9
GM12884	99,8	3 078	3 024	0	54	322 038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3 294	3 213	0	81	322 121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2 916	2 889	0	27	323 048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9 288	8 930	0	358	630 621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9 288	9 032	0	256	629 719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9 288	8 699	42	547	628 582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9 288	9 108	0	180	629 803	0	100	100	100

Tabell 15 innehåller studiedata som presenteras per prov, där varianternas resultat jämförs med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden. Detektering utvärderas för varje varianttyp separat – SNV:er, insertioner och deletioner. Referenspositioner ingår inte.

Tabell 15 Överensstämmelse i Somatic per prov, efter varianttyp

Prov	SNV:er			Insertioner			Deletioner		
	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2 457	2 457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1 539	1 539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1 836	1 836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2 025	2 025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1 782	1 782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5 454	5 392	0	1 782	1 647	0	2 052	1 891	0
GM12877-D7	5 454	5 406	0	1 782	1 728	0	2 052	1 898	0
GM12878-D5	5 454	5 192	28	1 782	1 651	9	2 052	1 856	5
GM12878-D7	5 454	5 445	0	1 782	1 719	0	2 052	1 944	0

De tio proverna analyserades vidare för bestämning av små insertioner och deletioner (indels) (Tabell 16). Det fanns totalt 71 indels i storlekarna 1–24 bp för insertioner och 1–25 bp för deletioner.

Tabell 16 Sammanfattning av indeldetektering i Somatic

Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA
Insertion	10 773	10 282	9	482	99,2
Deletion	11 502	10 667	5	830	>99,9

De 150 ampliconerna utformades för att täcka olika genomiska innehåll. Ampliconernas GC-innehåll varierade inom 0,19–0,87 %. Ampliconerna hade även en rad olika enkelnukleotid- (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Data sammanställdes per amplicon (Tabell 17) för att fastställa det genomiska innehålls effekt på procentandelen korrekta bestämningar. Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar.

Tabell 17 Noggrannhet på ampliconnivå i Somatic

Amplicon	Kromosom	Ampliconens start	Ampliconens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Ampliconens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35 066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), indel	0,38	29 827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34 202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34 613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30 571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), indel	0,39	26 452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT (3), TAA (3), indel	0,27	33 148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33 928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30 218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Ej tillämpligt	0,65	30 616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28 017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33 207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), indel	0,31	32 524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), indel	0,3	33 972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Ej tillämpligt	0,43	35 051	0	103	99,7

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), indel	0,42	27 459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), indel	0,27	34 534	0	620	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Ej tillämpligt	0,43	31 339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), indel	0,49	26 373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3)	0,41	32 829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27 925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29 327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36 585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Ej tillämpligt	0,29	29 427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), indel	0,36	23 356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25 942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), indel	0,27	22 944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Ej tillämpligt	0,78	28 299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA (3)	0,62	31 658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	Ej tillämpligt	0,39	24 120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), indel	0,3	31 297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25 277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34 308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28 266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38 489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34 730	0	46	99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), indel	0,61	35 057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	36 647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35 681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32 438	0	70	99,8
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), indel	0,61	35 441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34 354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Ej tillämpligt	0,44	27 575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33 060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG (4)	0,26	32 423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32 074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), indel	0,62	33 791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), indel	0,71	34 316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Ej tillämpligt	0,31	24 901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35 067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Ej tillämpligt	0,42	31 365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), indel	0,61	32 781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25 228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36 968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24 472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Ej tillämpligt	0,49	36 203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31 329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), indel	0,68	36 472	0	201	99,5

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), indel	0,47	29 473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34 188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29 843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33 968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35 829	0	81	99,8
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), indel	0,42	32 098	88	2 048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Ej tillämpligt	0,49	30 217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	30 531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Ej tillämpligt	0,45	36 105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26 318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Ej tillämpligt	0,65	37 785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23 368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Ej tillämpligt	0,59	38 546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27 516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Ej tillämpligt	0,42	32 083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34 047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32 065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA (3), indel	0,34	32 083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32 103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), indel	0,52	31 645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC (4)	0,33	34 824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Ej tillämpligt	0,49	30 497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26 773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35 830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Ej tillämpligt	0,52	27 498	0	114	99,6

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel	0,22	32 824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33 574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29 075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	25 313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Ej tillämpligt	0,25	31 360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), indel	0,19	26 499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30 494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34 313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24 555	0	1 527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35 472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36 264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25 667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34 745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35 870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26 762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Ej tillämpligt	0,36	34 286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26 449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Ej tillämpligt	0,27	23 809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35 860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32 835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39 177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), indel	0,37	34 075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33 632	0	11	>99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), indel	0,67	32 752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34 343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35 077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33 553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), indel (x2)	0,29	30 554	53	2 296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34 360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT (3), AT (4), AT (4), indel	0,26	34 367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29 751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32 176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31 604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25 273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Ej tillämpligt	0,37	34 386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG (3)	0,43	25 692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), indel	0,37	27 923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), indel	0,47	30 598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), indel	0,45	31 969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	24 531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	37 298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	27 881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	26 442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Ej tillämpligt	0,61	35 501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30 951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28 686	0	42	99,9

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensregioner	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta bestämmingar	Felaktiga bestämmingar	Saknade bestämmingar	% korrekta best
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3), TG(4), indel	0,46	26 372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38 159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25 188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32 969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32 818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24 758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA (3)	0,54	36 902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), indel	0,39	32 841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG (3), indel	0,32	25 939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33 942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37 733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Ej tillämpligt	0,68	36 617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36 525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Ej tillämpligt	0,6	37 398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34 754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26 046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26 019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Ej tillämpligt	0,52	26 780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt
149	Y	2655519	2655609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt

Resultaten från sekvenseringen av prov GM12878 jämfördes med en mycket säker genotyp för NA12878 som etablerats av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconerna låg 92 helt inom i de mycket säkra genomregionerna, 41 överlappade delvis och 17 ampliconer överlappade inte alls NIST-sekvensen. Det här resultatet gav 10 000 koordinater per replikat att jämföra. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Noggrannhetsresultaten visas i [Tabell 18](#).

Tabell 18 GM12878-provets överensstämmelse med NIST-databasen i Somatisk

Prov	Antal ampliconer	Genomsn. best.frekv.	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2 808	0	258 488	0	100	100	100

Baserat på data från denna somatiska studie på nio körningar kan NextSeq 550Dx-instrument konsekvent sekvensera:

- GC-innehåll $\geq 19\%$ (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer med 19 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 2,6 % saknade bestämningar)
- GC-innehåll $\leq 87\%$ (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer med 87 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 0,6 % saknade bestämningar)
- PolyA-längder ≤ 9 (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyA-upprepning med nio nukleotider bestämdes korrekt med 2,5 % saknade bestämningar)
- PolyT-längder ≤ 10 (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyT-upprepning med tio nukleotider bestämdes korrekt med mindre än 0,1 % saknade bestämningar)
- PolyG-längder ≤ 6 (alla bestämda baser i 2 268 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyG-upprepning med sex nukleotider bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- PolyC-längder ≤ 6 (alla bestämda baser i 756 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyC-upprepning med sex nukleotider bestämdes korrekt med 0,4 % saknade bestämningar)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 4x$ (alla bestämda baser i 1 890 sekvenserade ampliconer innehållande en 4x dinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,9 % saknade bestämningar)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 5x$ (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer innehållande en 5x trinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 1,4 % saknade bestämningar)
- Insertionslängder ≤ 23 (alla bestämda baser i 378 sekvenserade ampliconer innehållande en 23-nukleotidinsertion bestämdes korrekt med 0,8 % saknade bestämningar)
- Deletionslängder ≤ 25 (alla bestämda baser i 1 134 sekvenserade ampliconer innehållande en 25-nukleotiddeletion bestämdes korrekt med 0,7 % saknade bestämningar)

Precision

Precision för NextSeq 550Dx-instrument fastställdes genom att testa 13 unika Platinum Genome-prover med tre instrument, tre reagenspartier och tre operatörer för att skapa nio sekvenseringskörningar under fem startdagar. Representativ analys, prover och referensmetod är desamma som dem som beskrivs för studien av

noggrannhet i Germline. Precisionen fastställdes genom varianskomponentanalys med VAF som responsvariabel och beräkning av standardavvikelser på komponentnivå för instrument, reagensparti, operatör och startdag (Tabell 19). Det totala antalet observationer som användes i analysen för varje komponent av instrumentens, operatörernas eller reagenspartiernas variabilitet var 699, 176 och 235 för SNV:er, insertioner respektive deletioner.

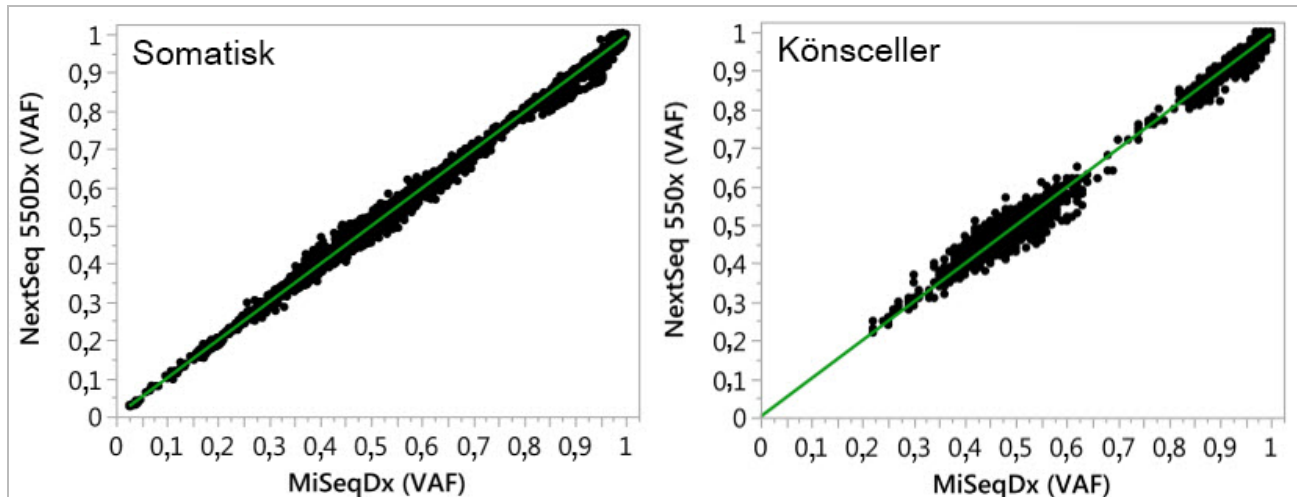
Tabell 19 Precisionsresultat för NextSeq 550Dx-instrumentet (standardavvikelse)

Komponent	Varianttyp	Komponentens SD		Total SD	
		Max	Median	Max	Median
Parti	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deletion	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertion	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deletion	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatör	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertion	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deletion	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dag	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertion	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deletion	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Metodjämförelse (sekvenseringsplattform)

Helblodsprover och FFPE-prover analyserades i NextSeq 550Dx-instrument och MiSeqDx-instrumentet med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och arbetsflödena i Germline och Somatic. Variantfrekvensernas överensstämmelse för blod- och FFPE-prover utvärderades med hjälp av flera representativa analyser. I Figur 2 illustreras VAF-korrelationen mellan de två instrumenten för en representativ analys och i Tabell 20 sammanfattas korrelationen efter analyspanel. Baserat på den starka korrelationen mellan MiSeqDx-instrumentet och NextSeq 550Dx-instrument har prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer (t.ex. extraktionsmetoder eller störande ämnen) fastställts vara tillämpliga på båda instrumenten. Mer information finns i bipacksedeln till TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Figur 2 VAF-korrelation mellan MiSeqDx- och NextSeq 550Dx-instrumenten för FFPE-prover (vänster) och blodprover (höger) med analys 1



Tabell 20 Resultat från metodjämförelse med unika blod- och FFPE-prover

gDNA-källa	Analys (oligo-panel)	Biologiska replikat (prover)	Tekniska replikat (per prov)	Observationer (antal varianter)	Lutning	Skärningspunkt	Korrelation (R ²)
Blod	Analys 1	45	2	8 369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Blod	Analys 2	45	2	5 457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Analys 1	46	2	8 319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Analys 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Två datapunkter har tagits bort baserat på de angivna begränsningarna för modulen Germline Variant (könscellsvariant).

²Koefficient för fastställande i VAF-diagrammen som visas i bild 2.

Reproducerbarhet

NextSeq 550Dx-instrument reproducerbarhet utvärderades med hjälp av Platinum Genome-prover i en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer och som använder 150 amplikoner. Könscellstesterna bestod av sju replikat av 13 prover. De somatiska testerna bestod av sex replikat av sju prover vid olika VAF-nivåer. Proverna bereddes med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Testerna utfördes vid tre externa laboratorier med ett parti av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler). Ett enda NextSeq 550Dx-instrument användes vid varje laboratorium. Två operatörer utförde testerna vid varje laboratorium. Varje operatör utförde tester under tre ej på varandra följande startdagar för varje provtyp, i totalt 36 körningar i de tre laboratorierna. Det gav 18 körningar vardera för arbetsflödena i Germline respektive Somatic.

Könsceller

Könsceallsvarianter med en VAF-nivå på $\geq 0,2$ rapporteras som positiva (variant). För förväntade positiva könsceallsvarianter utvärderades data med avseende på frekvens av saknade bestämningar och frekvens av korrekta positiva bestämningar inom varje varianttyp (SNV, insertioner, deletioner). [Tabell 21](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med den lägre och högre 95 % konfidensnivån (LCL/UCL) som beräknas med Wilson Score-metoden för varje varianttyp.

Tabell 21 Observerade könsceallsbestämningar för förväntade positiva resultat, efter varianttyp

Varianttyp	Saknade best.			Korrekt positiva best.				
	Observerade	Totalt	Procentandel	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110 376	0,014	110 349	110 360	99,99	99,98	99,99
Insertioner	1 026	37 044	2,77	36 018	36 018	100	99,99	100,00
Deletioner	648	34 776	1,86	34 128	34 128	100	99,99	100,00

Könsceallsvarianter med VAF $< 0,2$ rapporteras som negativa (vildtyp). För förväntade negativa könsceallsloci utvärderades data med avseende på frekvens av saknade bestämningar och frekvens av korrekta vildtypsbestämningar. [Tabell 22](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med den lägre och högre 95 % konfidensnivån (LCL/UCL) som beräknas med Wilson Score-metoden.

Tabell 22 Observerade könsceallsbestämningar för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Saknade best.			Korrekt negativa best.				
	Observerade	Totalt	Procentandel	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
Vildtyp	4 883	19 600 18	0,025	19 595 29	19 595 29	100	100,0	100,0
		2		9	9		0	0

Könsceallsvarianter med VAF-nivå $\geq 0,2$ och $< 0,7$ bestäms som positiva heterozygoter för varianten och varianter med VAF-nivå $\geq 0,7$ bestäms som positiva homozygoter för varianten. Könsceallsprover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen. I det syftet fastställdes Cx för vardera cutoff (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF fastställdes Cx $\geq 99,999$ %, vilket indikerar att $\geq 99,999$ % av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som heterozygota. För övre cutoff på 0,7 VAF fastställdes Cx $\leq 0,001$ %, vilket därmed indikerar att $\leq 0,001$ % av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som homozygota. [Tabell 23](#) sammanfattar resultaten per varianttyp.

Könsceallsvarianter med VAF-nivå $\geq 0,2$ och $< 0,7$ bestäms som positiva heterozygoter för varianten och varianter med VAF-nivå $\geq 0,7$ bestäms som positiva homozygoter för varianten. Könsceallsprover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen. I det syftet fastställdes Cx för vardera cutoff (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF fastställdes Cx $\geq 99,999$ %, vilket därmed indikerar att $\geq 99,999$ % av de heterozygota varianterna skulle

bestämmas som heterozygota. För övre cutoff på 0,7 VAF fastställdes $Cx \leq 0,001\%$, vilket indikerar att $\leq 0,001\%$ av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som homozygota. [Tabell 23](#) sammanfattar resultaten per varianttyp.

Tabell 23 Cx-värden för heterozygota varianter i Germline

Varianttyp	Cutoff vid 0,2 VAF	Cutoff vid 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insertioner	24/24	24/24
Deletioner	35/35	35/35
Totalt	153	153

Somatisk

Somatiska varianter med VAF-nivåer $\geq 0,026$ rapporteras som positiva (variant). Observationer med VAF-nivåer $\geq 0,01$ och $< 0,026$ betraktades som osäkra för den här analysen (varken positiva eller negativa, flaggade som låg variantfrekvens). Resultaten beräknades på följande tre sätt för att utvärdera prestandan:

- Bästa fall: Eventuella osäkra resultat betraktades som korrekta positiva bestämningar (överensstämmande med förväntat resultat)
- Sämsta fall: Eventuella osäkra resultat betraktades som inkorrekta bestämningar (ej överensstämmande med förväntat resultat)
- Uteslutningsfall: Eventuella osäkra resultat uteslöts ur analysen

I de tre tabellerna [Tabell 24](#), [Tabell 25](#) och [Tabell 26](#) sammanfattas bestämningsresultaten för bästa fall, sämsta fall och uteslutningsfall tillsammans med de lägre och högre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) som beräknats med hjälp av Wilson Score-metoden.

Tabell 24 Observerade somatiska bestämningar för förväntade positiva resultat, efter varianttyp (bästa fall)

Varianttyp	Korrekt positiva best.				
	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertioner	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Deletioner	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabell 25 Observerade somatiska bestämningar för förväntade positiva resultat, efter varianttyp (sämsta fall)

Varianttyp	Korrekt positiva best.				
	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertioner	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Deletioner	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Tabell 26 Observerade somatiska bestämningar för förväntade positiva resultat, efter varianttyp (osäkra bestämningar uteslutna)

Varianttyp	Korrekt positiva best.				
	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Insertioner	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Deletioner	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatiska varianter med VAF < 0,01 rapporteras som negativa bestämningar (vildtyp). För förväntade negativa somatiska loci utvärderades data med avseende på frekvens av saknade bestämningar och frekvens av korrekta vildtypsbestämningar. Korrekta vildtypsbestämningar fastställdes genom att utesluta saknade bestämningar och subtrahera de observerade bestämningar som föll inom det osäkra intervallet (VAF-nivåer $\leq 0,01$ och $< 0,026$) samt de inkorrekta bestämningar som låg över cutoff (VAF-nivåer $\geq 0,026$) från den totala summan. [Tabell 27](#) sammanfattar observerade, totala och procentandelen resultat för negativa somatiska loci, för frekvens av saknade bestämningar och frekvens av korrekta vildtypsbestämningar, tillsammans med de lägre och högre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) som beräknats med hjälp av Wilson Score-metoden.

Tabell 27 Observerade somatiska bestämningar för förväntade negativa resultat

Variant Typ	Saknade best.			Korrekta bestämningar						
	Observerade	Totalt	Procentandel	Osäkra	Inkorrekta	Korrekta	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
Vildtyp	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Somatiska prover vid olika VAF-nivåer för samma variant utvärderades för att fastställa analysens C95 (inom varje varianttyp). Prover med förväntade VAF-nivåer mellan 0,02 och 0,07 användes för att kunna bedöma variabiliteten nära analysens cutoff. C95 fastställdes för varje variant och högsta C95 för varje varianttyp rapporteras i [Tabell 28](#).

Tabell 28 Sammanfattning av C95 i Somatic

Varianttyp	N	C95
SNV	74	0,0613

Insertion	24	0,0573
Deletion	33	0,0575

Prestanda för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycle)

Översikt

NextSeq 550Dx har stöd för två reagenskit: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Man har utfört studier med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) för att visa att NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) kan uppfylla krav på analysprestanda som har verifierats och validerats med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler). Två biblioteksberedningar utfördes med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – en med Germline-arbetsflödet och en med Somatic-arbetsflödet. Bibliotek från varje arbetsflöde testades med tre partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) med hjälp av tre NextSeq 550Dx-instrument. Dessutom innefattade testerna för varje arbetsflöde en körning med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler).

Analytisk känslighet (gräns för blankprov [LoB] och detekteringsgräns [LoD])

Verifiering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) visade att NextSeq 550Dx-instrument kunde detektera varianter vid 0,05 VAF med ett typ II-fel på $\leq 0,05$ och att cutoff på 0,026 VAF som används av Somatic Variant Module (effektiv LoB) stöder ett typ I-fel på $\leq 0,01$. Baserat på dessa krav förväntar man sig att en variant vid 0,05 VAF är större än eller lika med 0,026 VAF 95 % av gångerna och att en vildtypsposition är mindre än 0,026 VAF 99 % av gångerna. För att kontrollera att dessa krav uppfylldes med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) utfördes upprepade mätningar på NextSeq 550Dx-instrumentet med vildtypsprover (LoB-prover) och med prover innehållande varianter vid 0,05 VAF (LoD-prover) med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Andel bestämningar över och under 0,026 cutoff jämfördes sedan med kraven som fastställts med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler).

Testerna innefattade två LoD-prover vardera med en unik uppsättning varianter riktade till 0,05 VAF och motsvarande LoB-prover som var vildtyper för riktade varianter. För biblioteksberedningen bearbetades LoD- och LoB-prover med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx i replikat om åtta och sju. Biblioteken sekvenserades först med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) för att identifiera varianter/genomiska koordinater för LoB-/LoD-utvärdering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Alla varianter med genomsnittlig VAF mellan 0,045 och 0,055 (LoD-varianter) baserat på resultaten från NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) användes för LoD-analys (N = 51 varianter). För LoB-analys bedömdes de 51 motsvarande genomiska koordinaterna.

För utvärdering av 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) sekvenserades bibliotek i tre körningar under tre på varandra följande dagar med samma instrument och reagenskitparti. De här testerna gav 24 replikat för var och en av de 51 LoD-varianterna och 21 replikat för varje motsvarande vildtypsposition. Andelen vildtypsbestämningar med VAF < 0,026 anges i [Tabell 29](#). Andelen LoD-variantbestämningar där VAF är större än eller lika med 0,026 visas i [Tabell 30](#).

Tabell 29 Andel bestämningar < 0,026 för vildtypspositioner (utvärdering av LoB-krav)

Variant Typ	Antal utvärderade positioner	Totalt antal observationer	Antal VAF-mätningar $\geq 2,6\%$	Andel < 2,6 %	Andel med 95 % konfidensintervall
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Insertion	11	231	0	1	0,984–1
Deletion	8	168	0	1	0,978–1

Tabell 30 Andel bestämningar $\geq 0,026$ VAF för LoD-varianter (utvärdering av LoD-krav)

Variant Typ	Antal utvärderade positioner	Totalt antal observationer	Antal VAF-mätningar < 2,6 %	Antal VAF-mätningar $\geq 2,6\%$	Andel $\geq 2,6\%$	Andel med 95 % konfidensintervall
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Deletion	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Noggrannhet

Könsceller

Följande studie utfördes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Germline Variant (könscellsvariant) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Tolv unika Platinum Genome-prover analyserades med en representativ analys. Totalt utfördes 11 körningar med hjälp av tre NextSeq 550Dx-instrument och tre NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).

Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med en väldefinierad och sammansatt referensmetod, Platinum Genome version 2016-1.0. Korrekta resultat från en sekvenseringskörning med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) anges som referens. En sammanfattning av resultaten finns i [Tabell 31](#).

Tabell 31 Sammanfattning av överensstämmelse i Germline

Kriterier	Totalt antal observationer (v2.5) ¹	Resultat, efter observation (v2.5) ²	Resultat, efter observation (v2) ³	Resultat, efter körning (v2.5) ⁴	Resultat, efter körning (v2) ⁴
PPA för SNV	1 056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
PPA för insertioner	1 056	100	100	100	100
PPA för deletioner	1 056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1 056	100	100	100	100
OPA	1 056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Beräknas som antalet prover per körning x antal körningar (96 prover per körning x 11 körningar = 1 056 observationer).

²Lägsta observerade värde per provreplikat över alla körningar (baserat på 11 körningar för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Lägsta observerade värde per provreplikat över en körning (totalt 96 observationer).

⁴Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

Somatisk

Följande studie utfördes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Somatic Variant (somatisk variant) i NextSeq 550Dx-instrumentet med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler). Tio Platinum Genome FFPE-prover (två med varianter utspädda till 0,05 VAF) testades med hjälp av en representativ analys. Totalt utfördes 11 körningar med hjälp av tre NextSeq 550Dx-instrument och tre partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).

Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med en väldefinierad och sammansatt referensmetod, Platinum Genome version 2016-1.0. Korrekta resultat från en sekvenseringskörning med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) anges som referens. En sammanfattning av resultaten finns i [Tabell 32](#).

Tabell 32 Sammanfattning av överensstämmelse i Somatic

Kriterier	Totalt antal observationer (v2.5) ¹	Resultat, efter observation (v2.5) ²	Resultat, efter observation (v2) ³	Resultat, efter körning (v2.5) ⁴	Resultat, efter körning (v2) ⁴
PPA för SNV	528	100	100	100	100
PPA för insertioner	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA för deletioner	528	100	100	100	100
NPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9
OPA	528	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

- ¹Beräknas som antalet prover per körning x antal körningar (48 prover per körning x 11 körningar = 528 observationer).
²Lägsta observerade värde per provreplikat över alla körningar (baserat på 11 körningar för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).
³Lägsta observerade värde per provreplikat över en körning (totalt 96 observationer).
⁴Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

Precision

Könsceller

Precisionen för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) med modulen Germline Variant (könscellsvariant) utvärderades med Platinum Genome-prover och en representativ analys. Testerna bestod av en biblioteksberedning med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och innefattade 12 prover som bearbetats med åtta replikat var. Bibliotek sekvenserades med tre partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) och tre NextSeq 550Dx-instrument i totalt nio sekvenseringskörningar.

Prover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen (N = 153 unika heterozygota varianter). Cx fastställdes för vardera cutoff för modulen Germline Variant (könscellsvariant) (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF fastställdes varianten med minsta tillåtna Cx för NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cykler) vara > 99,9 %, vilket indikerar att > 99,9 % av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som heterozygota. För övre cutoff på 0,7 VAF fastställdes varianten med största tillåtna Cx för NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cykler) vara < 1,5 %, vilket indikerar att ≤ 1,5 % av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som homozygota. [Tabell 33](#) sammanfattar resultaten per varianttyp. Cx-värden från en sekvenseringskörning med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) anges som referens.

Tabell 33 Cx-värden för heterozygota varianter i Germline

Varianttyp	N	Cutoff vid 0,2 VAF		Cutoff vid 0,7 VAF	
		Min. Cx (v2.5) ¹	Min. Cx (v2) ²	Max. Cx (v2.5) ¹	Max. Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Insertioner	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1 %
Deletioner	35	100 %	>99,9 %	< 0,1 %	< 0,1 %

¹Cx-värden baserade på uppskattningar av den totala standardavvikelsen från varianskomponentanalys.

²Cx-värden baserade på provstandardavvikelser.

Somatisk

Precisionen av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) med modulen Somatic Variant (somatisk variant) utvärderades med hjälp av Platinum Genome FFPE-prover och en representativ analys. Testerna bestod av en biblioteksberedning med hjälp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och innefattade två prover med åtta replikat var. Bibliotek sekvenserades med tre partier av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) och tre NextSeq 550Dx-instrument i totalt nio sekvenseringskörningar.

Somatiska varianter med förväntade VAF-nivåer $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unika varianter) användes för att utvärdera instrumentets variabilitet nära VAF-cutoff för modulen Somatic Variant (somatisk variant) (somatiska varianter med VAF-nivå $\geq 0,026$ bestäms som positiva för varianten). C95-värden fastställdes för varje somatisk variant. C95-värden representerar VAF vid vilken sannolikheten för att vara större än VAF-cutoff för modulen Somatic Variant (somatisk variant) är 95 %. De högsta C95-värdena per varianttyp har rapporterats i [Tabell 34](#). C95-resultat från en sekvenseringskörning med hjälp av NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) anges som referens.

Tabell 34 Sammanfattning av C95 i Somatic

Varianttyp	Antal utvärderade varianter	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insertioner	24	0,062	0,061
Deletioner	33	0,060	0,060

¹C95-värden baserade på uppskattningar av den totala standardavvikelsen från varianskomponentanalyser.

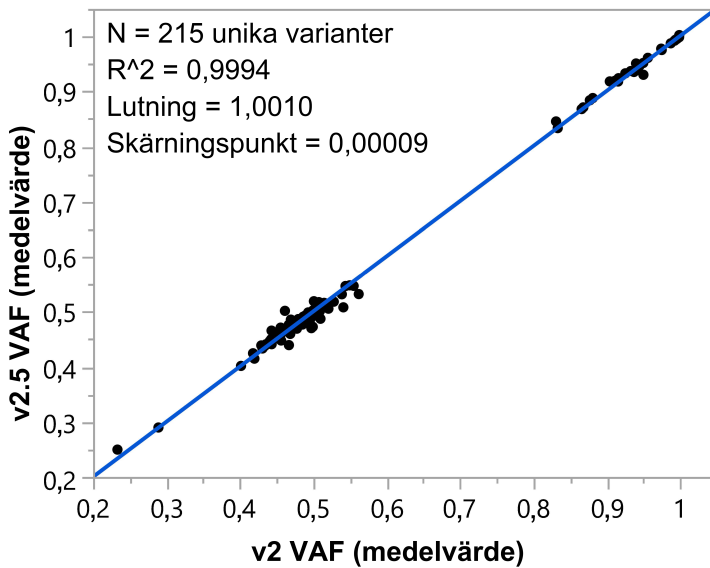
²C95-värden baserade på provstandardavvikelser.

Metodjämförelse (reagenskit)

Könsceller

Genomsnittliga VAF från 215 unika varianter utvärderades med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) med hjälp av resultat från modulen Germline Variant (könscellsvariant)e. VAF-medelvärdena beräknades utifrån 11 sekvenseringskörningar i v2.5 och en sekvenseringskörning i v2. Minst åtta replikat användes för att beräkna medelvärdet för varje variant. I [Figur 3](#) visas VAF-korrelationen mellan de två reagenskiten. Baserat på den starka och linjära VAF-korrelationen och de liknande resultaten mellan reagenskit har prestandaegenskaperna som först verifierats och validerats med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och modulen Germline Variant (könscellsvariant) fastställts gälla för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).

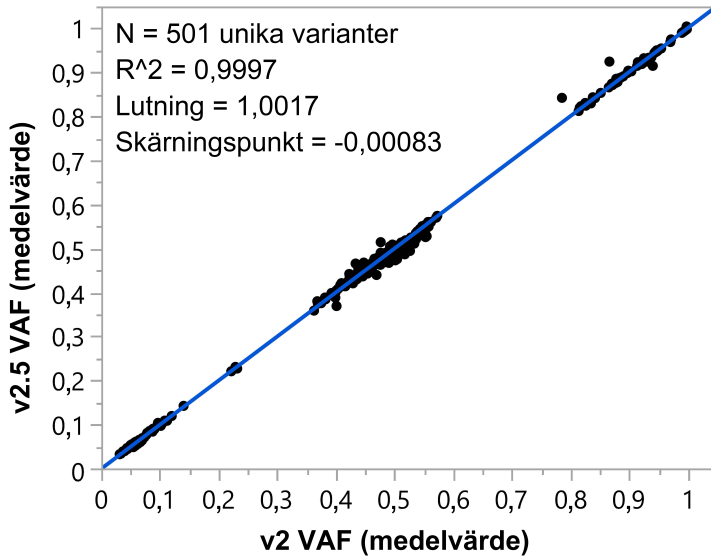
Figur 3 Variantallelfrekvenskorrelation (VAF) för Modulen Germline Variant (könsellsvariant) mellan NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).



Somatisk

Genomsnittliga VAF från 501 unika varianter utvärderades med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler) med hjälp av resultat från modulen Somatic Variant (somatisk variant). VAF-medelvärdena beräknades utifrån 11 sekvenseringskörningar i v2.5 och en sekvenseringskörning i v2. Minst tre replikat användes för att beräkna medelvärdet för varje unik variant. I [Figur 4](#) visas VAF-korrelationen mellan de två reagenskiten. Baserat på VAF-korrelationen och de liknande resultaten mellan reagenskit har prestandaegenskaperna som verifierats och validerats med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och modulen Somatic Variant (somatisk variant) fastställts gälla för NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).

Figur 4 Variantallelfrekvenskorrelation (VAF) för modulen Somatic Variant (somatisk variant) mellan NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cykler).



Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 200031448 v00	Juni 2023	<p>Första utgåvan.</p> <p>Tidigare dokument 1000000030326 ersattes av detta.</p> <p>Ändringar från dokument 1000000030326 v6 till detta nya dokument:</p> <ul style="list-style-type: none"> Lagt till innehåll som stöd för tillvalet Illumina DRAGEN Server för NextSeq 550Dx. Uppdaterat luftfiltrets artikelnummer. <p>Ändringar som tidigare gjorts i dokument 1000000030326:</p> <ul style="list-style-type: none"> Uppdateringar gjorda för att korrigera innehåll som oavsiktligt lagts till från källprogramvaran. Information om rapportering av allvarliga händelser har lagts till i avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder. Lagt till ett meddelande i Procedurprinciper som specificerar avsedd användare. En referens till High Output Reagent Kit v2 (300 cykler) har tagits bort. En referens till High Output Reagent Kit v2.5 (75 cykler) har lagts till. Tabellen Revisionshistorik har lagts till. Adressen till den auktoriserade europeiska representanten har uppdaterats.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas noggrant och uttryckligen av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivningen häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2023 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformation



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australisk sponsor

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

Märkning av produkter

För en fullständig referens till symboler som visas på produktens förpackning och märkning, se symbolnyckeln på support.illumina.com på fliken *Documentation* (Dokumentation) för din sats.