

Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK.

Avsedd användning

TruSight™ Whole Genome är en kvalitativ *in vitro*-diagnostisk enhet avsedd för helgenomsekvensering och detektion av enstaka nukleotidvarianter, insertioner/deletioner, kopietalsvariationer, körningar av homozygositet, korta tandemupprepningsexpansioner och mitokondriella variationer i mänskligt genomiskt DNA extraherat från blod.

TruSight Whole Genome inkluderar TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes och TruSight Whole Genome Analysis Application-programvaran. Enheten är avsedd att användas med kompatibla nedströms könscellsapplikationer för att utveckla *in vitro*-diagnostiska analyser och av kvalificerad laboratoriepersonal och analysutvecklare.

TruSight Whole Genome är avsedd att användas på NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Sammanfattning och förklaring

TruSight Whole Genome är en nästa generations sekvenseringsanalys som använder tagmenteringsbaserad PCR-fri bibliotekspreparering, med början från genomiskt DNA (gDNA) extraherat från perifert helblod från människa, och sekvensering och primär analys på Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundär analys utförs med TruSight Whole Genome Analysis Application programvaran på den inkluderade och nödvändiga Illumina DRAGEN Server för NovaSeq 6000Dx och inkluderar demultiplexering, anpassning till GrCh38/hg38 mänskligt referensgenom och variantbestämning, samt annotering och tillämpning av de metriska specifikationerna för kvalitetskontroll (QC) i [Tabell 1](#) för att säkerställa analytisk prestanda. Analysens resultat inkluderar rapporter om QC-rapporter om körning och prov samt filer för genomvariantbestämningsformat (VCF) för användning med kompatibla nedströms tertiäranalys- och rapporteringsprogram.

TruSight Whole Genome utvärderar genomiska varianter i hela kodnings- och icke-kodningsregionerna i det mänskliga genomet. Variantbedömning omfattar detektion av små varianter, kopietalsvarianter (CNV), körningar av homozygositet (ROH) och korta tandemupprepningar (STR). Dessutom TruSight Whole Genome detekterar frånvaron av SMN1 c.840C-allelen (NM_000344.3:c.840C>T), vilket skulle kunna indikera SMN1-gendeletion eller SMN1/SMN2-genkonvertering.^{1,2} Biallelisk förlust av SMN1 c.840C-allelen är ansvarig för cirka 95 % av fallen av spinal muskelatrofi (SMA).³

[Tabell 2](#) ger information om varianttyperna som validerats med TruSight Whole Genome.

Tabell 1 TruSight Whole Genome Specifikationer för kvalitetsmätvärden

Utdata typ	Mätvärde	Specifikation
QC för sekvenseringskörning	Totalt % \geq Q30	$\geq 85,0$
QC för FASTQ	Utbyte per prov (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$
QC för biblioteksprov	Genomsnittlig autosomal täckning	$\geq 35,0$
	Procentandel autosomer med mer än 20 x täckning	$\geq 93,94$
	Normaliserad täckning vid 60 % till 79 % GC-grupper	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normaliserad täckning vid 20 % till 39 % GC-grupper	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Genomsnittlig mitokondriell täckning	$\geq 500,0$
	Procent Q30-baser	$\geq 85,0$
	Uppskattad provkontaminering	$\leq 0,005$

Tabell 2 Upptäckta varianter validerade med TruSight Whole Genome

Varianttyp	Validerad variantdetektering
Små varianter	Enkelnukleotidvarianter (SNV), korta insertioner/deletioner (1–31 bp)
Kopietalsvarianter (CNV:er)	≥ 10 kb vinster och förluster
Körningar av homozygositet (ROH)	≥ 500 kb
Mitokondriella SNV:er	% heteroplasm om $\geq 4,75$ %
Expansioner av kort tandemrepetition (STR)	Riktade loci (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B och TBP)
SMN1-variant	NM_000344.3:c.840C/T

Principer för proceduren

TruSight Whole Genome är avsedd för preparering av PCR-fria bibliotek för att producera mänskliga helgenomsekvenseringsdata. Analysen börjar med att preparera bibliotek från kvantifierat genomiskt DNA extraherat från perifert mänskligt helblod, inkluderar sekvensering och analys på NovaSeq 6000Dx Instrument med användning av TruSight Whole Genome Analysis Application och slutar med variantbestämning och annotering.

TruSight Whole Genome-analysen består av följande steg:

- **Batchplanering och skapande av körning** – Vi rekommenderar starkt att du planerar batchen och körningarna innan du påbörjar biblioteksprepareringen. Upp till 24 provbibliotek kan prepareras i en biblioteksprepareringsbatch. Baserat på antalet prover kan olika flödescellskonfigurationer användas (6-plex på S2 och 16-plex på S4). Biblioteksrörs-ID, provnamn och motsvarande indexering registreras under körningsplanering och skapande av körning. För mer information om skapande av körning ska du se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931). Följ den planerade batchen under utförandet av arbetsflödet för bibliotekspreparering.
- **Förberedelse för protokoll** – Vissa reagenser är frysta och måste anta rumstemperatur. På grund av det korta arbetsflödet är det möjligt att slutföra förberedelser och starta sekvenseringen samma dag. Således kan även förbrukningsmaterial för sekvensering för planerade körningar tas under detta steg. Kvantifierade genomiska DNA-prover tas och späds för optimerad DNA-inmatning.
- **Bibliotekspreparering**
 - **Tagmentera genomiskt DNA** – Använder Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) för att tagmentera DNA-inmatning. Under tagmentering är gDNA fragmenterat, taggat med adapterar och immobiliserat på ytan av magnetiska BLT-PFkuler.
 - **Rengöring efter tagmentering** – Rengör adaptertaggat DNA på BLT-PF och tar bort stoppbuffert för att förbereda för ligatindex.
 - **Ligate Index** – Lägger till unika dubbla index till bibliotek för att möjliggöra multiplexering. Utför luck-förlängning och eluerar enkelsträngade DNA-bibliotek vid sidan av kuler.
 - **Storleksval och rengöring av bibliotek** – En kulrening med dubbelsidigt storleksval tar bort fragment som är för små och för stora för att rikta in sig på en medianfragmentlängd på cirka 450 bp, intervall ca 360 till 550 bp.
 - **Poola och denaturera bibliotek** – Självnormeringsfunktionen i BLT-PF möjliggör poolning enligt volym utan qPCR eller annan normalisering. Den angivna volymen för varje bibliotek poolas enligt planen för varje körning och denatureras med 0,2N NaOH (utspädd HP3). Den denaturerade poolen överförs sedan till NovaSeq 6000Dx-biblioteksroret med det ID som motsvarar den planerade körningen.
- **Sekvensering och analys** – Förbrukningsmaterial i S2- och/eller S4-konfigurationen läses in på NovaSeq 6000Dx Instrument, inklusive tillhörande NovaSeq 6000Dx-biblioteksror med poolade bibliotek. Vid laddning skannas biblioteksrörs-ID och, om det anges under körningsplanering, används för att välja motsvarande planerade körning. Annars måste den associerade planerade körningen väljas manuellt. Poolade bibliotek samlas i kluster på en flödescell och sekvenseras därefter med hjälp av sekvensering genom syntes (SBS-kemi) på NovaSeq 6000Dx. SBS-kemi använder en metod med reversibel terminator för att detektera fluorescensmärkta enkelnukleotidbaser när de införlivas i växande DNA-strängar. Programvaran Real-Time Analysis (RTA) utför primär analys som omfattar basbestämning samt tilldelar en kvalitetspoäng till varje basbestämning. Primära analysdata överförs automatiskt till Illumina DRAGEN-servern.
Demultiplexering och DRAGEN-analys utförs automatiskt med hjälp av TruSight Whole Genome Analysis Application. Som en del av denna analys granskas varje körning och provbibliotek för validitet med hjälp av analytiska mätvärden som beskrivs i [Kvalitetskontroller på sidan 31](#) och resultaten tillhandahålls i

konsoliderade och individuella provrapporter. För giltiga provbibliotek genereras annoterade genomiska variantbestämningsformatfiler (VCF-filer). Mer information om analysarbetsflödet finns i TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).

Begränsningar

- För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- TruSight Whole Genome är kompatibel med genomiskt DNA härlett från mänskligt perifert helblod.
- Analysen inkluderar inte reagenser för DNA-extraktion eller kvantifiering. De analytiska testresultaten, inklusive [Interfererande substanser på sidan 37](#), har erhållits med helblod med hjälp av representativa DNA-extraktionssatser och DNA-kvantifieringssatser. Alla diagnostiska tester som utvecklats för att användas med TruSight Whole Genome kräver fullständig validering för alla prestandaaspekter med valda DNA-extraktions och DNA-kvantifieringssatser.
- Analysen har konfigurerats och testats för de provplexitets- och indexuppsättningar som anges i följande tabell.

Batchstorlek för bibliotekspreparering	Plexitet	Kör konfiguration	Indexering
6, 12, 18 eller 24 prover	6-plex	1–4 S2-körningar	S2 Ställ in 1 till 4
16 prover	16-plex	1 S4-körning	S4 Ställ in 1 eller 2
22 prover	16-plex + 6-plex	1 S4-körning + 1 S2-körning	S4 ställ in 1 eller 2, S2 ställ in 1 till 4 (används inte för S4)

- Analysen framtvogar inte positiv provspårning. Även om det sammanfattande QC-resultatet för ploiditet som rapporteras av programvaran valfritt kan användas för att identifiera provbyten, kommer det inte att identifiera män som bytts ut mot män eller kvinnor som bytts ut mot kvinnor.
- Analysen ger endast validering upp till utdata för genom-VCF-filer. Alla diagnostiska tester som utvecklats för att användas med TruSight Whole Genome kräver fullständig validering för alla prestandaaspekter med nedströms valda applikationer.
- Analysen rapporterar inte variantbestämningar för prover som underkänns i kvalitetskontroll.
- Analysen definierar höga konfidensnivåer endast för SNV:er och insertioner/deletioner 1–5 bp på grund av strikta kriterier som används för att definiera ett genomiskt sammanhang som hög konfidens för en viss varianttyp i [Bestämning av konfidensnivå för små varianter på sidan 38](#).
- Analysen är utformad för att utvärdera CNV:er över hela det rapporterbara genomet, oavsett genomsammanhang, och utesluter regioner med funktioner som återspeglar begränsningar av referensgenomet, såsom centromerer, telomerer och vanliga CNV:er som segregerar i populationer.
- Analysprestandan bedömdes inte för kopietalsvarianter under 10 kb.
- Analysen rapporterar inte translokationer, inversioner eller balanserade omarrangemang.

- Analysprestandan utvärderades inte för insertioner eller deletioner av mitokondriellt DNA (mtDNA).
- Analysen rapporterar endast resultat för STR-loci som listas i [Tabell 2](#). När de sanna STR-expansionslängderna överstiger cirka 135 bp kommer den observerade längden ofta att vara en underskattning av den sanna längden på grund av tekniska begränsningar för korta avläsningar och där denna effekt är ännu mer uttalad för FMR1. När den verkliga STR-längden överskrider medianfragmentlängden (ca 330 bp), når uppskattningen av STR-längd en plattå.
- Analysen rapporterar inte kopietal för SMN1 eller SMN2.
- Analysen gör inga påståenden om patogeniciteten hos de detekterade varianterna.

Produktkomponenter

TruSight Whole Genome består av följande:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (katalognr 20093209) och
- TruSight Whole Genome Analysis Application (katalognr 20106190, installerad av utbildad Illumina-personal)

Reagenser

Reagenser som tillhandahålls

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Reagensnamn	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads (streptavidinmagnetiska kulor) kopplade till transposomer i buffrad vattenbaserad lösning.	-25 °C till -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligas, DNA Polymerase och dNTP:er i buffrad vattenbaserad lösning.	-25 °C till -15 °C
2 N NaOH (HP3)	1	400 µl	2 N natriumhydroxidlösning (NaOH).	-25 °C till -15 °C

Reagensnamn	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller magnesiumsalt och dimetylformamid.	-25 °C till -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Reagensnamn	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel och salt.	15 °C till 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Buffrad vattenbaserad lösning.	15 °C till 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Paramagnetiska kulor, i fast fas, i buffrad vattenbaserad lösning.	15 °C till 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Rengöringsmedelslösning i vatten.	15 °C till 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl-lösning.	15 °C till 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Reagensnamn	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaringstemperatur
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Unika dubbla (UD) indexadapterar arrangerade i platta.	-25 °C till -15 °C

Nödvändigt förbrukningsmaterial – tillhandahålls inte

- Etanol, 100-procentig (200 proof) för molekylärbiologisk användning
- Certifierat RNase/DNase-free water
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube 24 Pack (katalognr 20062291)

Förvaring och hantering

- Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
- Om någon av förpackningarna för eller innehållet i TruSight Whole Genome Dx Library Prep är skadade eller öppnade ska du kontakta Illuminas kundtjänst.
- Reagensen är stabila när de förvaras enligt anvisningarna och fram till det angivna utgångsdatumet på satsens etiketter. För förvaringsförhållanden ska du se [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#). Förvara analyskomponenterna vid sina specificerade temperaturer och använd inte reagenser som passerat utgångsdatum. Byt inte ut satskomponenter mot komponenter från andra satspartier. Satspartier kan identifieras på etiketterna på förpackningen.
- Förändringar av reagensernas utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Använd inte reagenserna om förändringar av deras utseende observeras (t.ex. uppenbara förändringar av reagensens färg eller grumlighet). Om fällning observeras för ST2 ska du värma till 37 °C i tio minuter vortexblanda sedan tills fällningarna löses upp.
- Stabilitet för TruSight Whole Genome Dx Library Prep har utvärderats och prestanda demonstrerats för upp till fyra användningar av de frusna rören när de är frusna mellan användningar.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning – tillhandahålls inte

Verifiera utrustningens kalibreringsstatus innan analysen påbörjas.

Utrustning	Tillverkare
Vortexblandare med kapacitet för 3 000 rpm, platt botten eller bägare	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikroprovsinkubator kalibrerad för att säkerställa temperaturnoggrannhet på ± 2 °C	SciGene, katalognr 1057-30-O (eller motsvarande)
Insats till mikroprovsinkubator för MIDI-plattor med 96 brunnar	Illumina, katalognr BD-60-601
Mikrocentrifug	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Centrifug för mikroplattor med 96 brunnar	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Plattskakare med följande specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Kan skaka vid 1 800 rpm • Blandningsbana konstant 2 mm • Blandningsnoggrannhet på ± 25 rpm 	VWR, katalognr 1808-0506 (eller motsvarande)

Utrustning	Tillverkare
Förseglingsrulle eller -kil	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Ett magnetiskt stativ med följande specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Utformat för precipitation/separation av paramagnetiska kulor • Magneter på sidan av stativet, inte nertill • För MIDI-plattor med 96 brunnar 	Thermo Fisher Scientific, katalognummer AM10027 (eller motsvarande)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, katalognr 20068232
Precisionspipetter (en kanal): <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 20 µl • 200 µl • 1 000 µl 	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Precisionspipetter (8 kanaler): <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl • 200 µl 	
Se till att pipetter kalibreras regelbundet och är korrekta inom 5 % av den angivna volymen	
Pipetthållare	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

Nödvändigt material – tillhandahålls inte

Kontrollera att du har det material som behövs innan du startar protokollet.

Protokollet har optimerats och validerats med hjälp av de listade objekten. Jämförbar prestanda kan inte garanteras vid användning av andra material.

Material	Tillverkare
Serologiska pipetter, 5 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Serologiska pipetter, 10 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Avdragbar, transparent polyester • Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar från -40 °C till 110 °C • DNAs-/RNAs-fria 	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Mikrocentrifugrör, nukleasfria (1,5, 1,7 eller 2,0 ml, såvida inte 0,5 ml anges)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning

Material	Tillverkare
Nukleasfria reagensbehållare, 50 ml eller motsvarande (PVC, engångstråg)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Koniska rör, 15 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Koniska rör, 50 ml	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Aerosolresistenta pipettspetsar, 20 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Aerosolresistenta pipettspetsar, 200 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Aerosolresistenta pipettspetsar, 1 000 µl	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Förvaringsplattor för 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-platta)	Thermo Fisher Scientific, artikelnr AB-0859 (eller motsvarande)
PCR-plattor med 96 brunnar, 0,2 ml (polypropen som är fritt från RNase/DNase, låg bindning)	Valfri leverantör av laboratorieutrustning
Ishink och is	Ej tillämpligt
Kvantifierade genomiska DNA-prover	Ej tillämpligt

Insamling, transport och förvaring av prover



FÖRSIKTIGHET

Hantera alla prover som potentiellt smittsamma ämnen.

- Följ säkerhetsprocedurer, inklusive användning av personlig skyddsutrustning, vid insamling, transport, förvaring och bearbetning av mänskliga blodprover.
- Transport av helblod måste följa nationella, federala, delstatliga och lokala föreskrifter för transport av etiologiska agens.
- Samla in 2–5 ml perifert helblod i EDTA-rör och förvara vid 2 °C till 8 °C i upp till fem veckor före extraktion.
- Ingen negativ effekt på analysens resultat observerades med helblodsprov med förekomst av förhöjda värden av bilirubin, hemoglobin, triglycerider, biotin eller EDTA. Se Interfererande substanser.
- TruSight Whole Genome är kompatibel med kommersiellt tillgängliga extraktionssatser och protokoll som är lämpliga för användning i nästa generations sekvensering (NGS). Se [Utvärdering av DNA-extraktionsmetod på sidan 36](#).
- TruSight Whole Genome är kompatibel med DNA eluerat i en Tris-buffrad lösning innehållande ≤ 10 mM EDTA, såsom 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Eluering och lagring av DNA i TE rekommenderas. För stabilitet ska du undvika förvaring i vatten.

Rekommendationer DNA-inmatning

- Innan TruSight Whole Genome-analysen påbörjas ska du kvantifiera det genomiska DNA som extraherats från helblod genom att använda någon fluorometrisk kvantifieringsmetod som använder nukleinsyrebindande färgämnen. Det rekommenderas att gDNA för prover avsedda för en viss biblioteksprepareringsbatch och sekvenseringskörning kvantifieras tillsammans för att eliminera variabilitet mellan batcher när så är möjligt, eller att processkontroller används för att säkerställa $\leq 25\%$ variabilitet mellan DNA-kvantifieringar mellan batcher.
- Undvik pipettering av små provvolymmer ($< 2 \mu\text{l}$) för att säkerställa korrekt DNA-kvantifiering och inmatning.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep kräver tillräckligt med DNA för att mätta BLT-PF-kulorna för effektiv självnormalisering av biblioteksutbyten och optimal prestanda. På grund av variationen av resultat från olika kvantifieringsmetoder ger följande tabell den rekommenderade DNA-inmatningen för tre kvantifieringsmetoder för att säkerställa optimal analysprestanda. Användning av andra kvantifieringsmetoder kan kräva optimering. Se [Känslighet för DNA-inmatning på sidan 36](#).

Kvantifieringsmetod	Inmatning av mål-DNA (ng)	Minsta DNA-stamkoncentration
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ μl

Kompetensrekommendationer

Operatörens kunskaper och framgångsrik analysimplementering kan bedömas genom att utföra hela arbetsflödet en gång enligt bruksanvisningen. Detta arbetsflöde kan utföras med antingen en enda bibliotekspreparering med 6 prover och en sekvenseringskörning med en S2-flödescell eller en enda bibliotekspreparering med 16 prover och en sekvenseringskörning med en S4-flödescell. Framgång indikeras genom att körnings- och biblioteks kvalitetskontrollmått som registrerats i den konsoliderade rapportens resultat godkänns av TruSight Whole Genome Analysis Application-programvaran. Se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).

Illumina rekommenderar inklusion av genomiska DNA-prover extraherade från perifert helblod som uppfyller kvalificeringskriterierna för DNA-stamkoncentration och -volym för att visa framgångsrik analysintegration med uppströms laboratorieprocesser såsom provtagning och lagring, samt DNA-extraktion och kvantifieringsprocedurer. Kommersiellt tillgängliga DNA-referensprover från en enda mänsklig donator som NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium) kan också användas.

Om problem uppstår ska du se avsnittet [Felsökning på sidan 71](#) för rekommenderade åtgärder och kontakta Illumina teknisk support.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- **Vissa analyskomponenter innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laborierock 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. Säkerhetsdatablad (SDS) finns på support.illumina.com/sds.html.**
- Rapportera omedelbart alla allvarliga händelser relaterade till den här produkten till Illumina och behöriga myndigheter i det land där användaren och patienten befinner sig.
- Hantera alla prover som smittsamma ämnen.
- Arbeta enligt vedertagna laborierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laborierock vid hantering av prov och analysreagenser. Tvätta händer noga efter att du hanterat prov och analysreagenser.
- Denna analys innehåller polyetylenglykol. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt.
- Denna analys innehåller natriumhydroxid. Personskador kan uppstå vid inandning, förtäring, hudkontakt och ögonkontakt.
- Biblioteksprepareringarna kräver en RNas-/DNas-fri miljö. Dekontaminera alla arbetsområden noggrant med ett RNas-/DNas-hämmande rengöringsmedel.
- Använd nukleasfria mikrocentrifugrör, plattor, pipettspetsar och behållare.
- Använd kalibrerad utrustning under hela analysen. Var noga med att kalibrera utrustningen efter de hastigheter, temperaturer och volymer som anges i det här protokollet.
- Använd precisionspipetter för att säkerställa korrekt reagens- och provöverföring. Kalibrera regelbundet i enlighet med tillverkarens specifikationer.
- Var noga med att använda den utrustning som anges för analysen och att konfigurera program enligt anvisningarna.
- Angivna temperaturer för mikroprovsinkubatorn indikerar inställd reaktionstemperaturer och inte nödvändigtvis utrustningens temperatur.
- Byt inte ut satskomponenter mot komponenter från olika TruSight Whole Genome Dx Library Prep-partier. Partier kan identifieras på etiketten som sitter på förpackningen.
- God laborieresed krävs för att förhindra att nukleaser och PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument, prover och bibliotek. Kontaminering från nukleaser och PCR-produkter kan orsaka felaktiga och otillförlitliga resultat.

- Rätt platttyp krävs för optimal analysprestanda och förvaring. Var noga med att följa anvisningarna för plattöverföring i avsnittet [Bruksanvisning på sidan 15](#).
- Korskontaminering eller provförlust kan inträffa om plattförsęglingar inte appliceras eller tas bort försiktigt (se [Hantering av biblioteksprepareringsplattor på sidan 13](#)).
- Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra bibliotekskvaliteten.
- Förvara analysreagenserna vid angiven temperatur.
- Förvara inte reagenser i en frostfri förvaringsenhet.
- Använd inte reagenser som har förvarats på ett felaktigt sätt.
- Använd inte några komponenter efter det utgångsdatum som anges.
- Bered 0,2N NaOH (utspädd HP3) färskt på användningsdagen och kassera den återstående volymen efter användning.
- Bered färsk 80 % etanol med RNase/DNase-free water på användningsdagen. Etanol kan absorbera vatten från luften, vilket kan påverka resultaten. Kassera 80-procentig etanol efter användning i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter. Använd etanol av molekylärbiologisk kvalitet.

Metodanmärkningar

Tips och tekniker

Undvika korskontaminering

- Byt spets mellan *varje prov* när du tillsätter eller överför prover.
- När du tillsätter indexadaptrar eller primrar med en flerkanalspipett ska du byta spets mellan *varje brunn*.
- Försegla och öppna försiktigt plattorna på en bänkskiva för att förhindra korskontaminering av prover.
- För att undvika kontaminering är varje indexbrunn avsedd för engångsbruk.
- Använd angivna trågvolymer och håll inte återstående volym från tråget tillbaka in i stamrören eftersom detta kan orsaka kontaminering. Det finns tillräcklig volym för att stödja arbetsflödet.
- Poola inte bibliotek från olika prepareringar tillsammans.

Noggrannhet vid pipettering

Tillämpa följande riktlinjer när du använder pipetter med flera kanaler:

- Kontrollera att spetsarna sitter ordentligt och är lämpliga för pipettmärket och -modellen.
- Fixera spetsarna med en rullande rörelse för att säkerställa att alla spetsar sitter lika bra.
- Aspirera med samma volymnivåer i alla spetsar.
- Pipettera viskösa lösningar (BLT-PF,CB,ELM,TWB2) långsamt.
- Säkerställ att vätska har dispenserats från varje spets efter dispenserering.

Undvik skumbildning

- Pipettera långsamt och vänd för att blanda. Vortexblanda inte ELM och TWB2.

Hantering av indexplattor

- Genomborra folieförsegling endast för index som ska användas.
- Hantera plattan längs kanterna och undvik att vidröra folieförseglingen med något annat än rena pipettspetsar.
- Återanvänd inte brunnar som har genomborrats.
- Kassera oanvänd volym (ca 30 µl) efter användning från genomborrade brunnar på indexplattan och placera förseglingen över genomborrade brunnar för att undvika korskontaminering.
- Placera inte förseglingen över oanvända brunnar eftersom detta stör genomborrningen.

Hantering av biblioteksprepareringsplattor

- Försegla alltid plattan före förvaring, skakning, inkubation eller centrifugering.
- Försegla plattan genom att applicera det självhäftande omslaget på plattan med en förseglingsrulle eller -kil.
- Kontrollera att kanterna och brunnarna är fullständigt förseglade för att reducera risken för korskontaminering och avdunstning.
- Försegla alltid plattor med en ny självhäftande plattförsegling. Återanvänd inte förseglingar.
- Placera plattan på en plan yta innan du försiktigt tar bort förseglingen.
- Om inte annat anges kan steg utföras med plattan på eller av magneten.

Plattöverföringar

- Vid överföring av volymer mellan plattor ska du överföra den angivna volymen från varje brunn på källplattan till motsvarande brunnar på målplattan.

Tråg

- Reagenstråg kan användas där så anges. Använd följande riktlinjer:
 - Bered tråget efter CB vortexblandning. Det är inte nödvändigt att returnera CB till röret och vortexblanda före det andra steget med tillsats av kulor.
 - Märk TWB2- och RSB-tråg för att undvika förvirring.
 - Kassera reagenser när det indikeras eller i slutet av arbetsflödet.
- Använd rekommenderad volym. Rekommenderade volymer inkluderar 1 ml överskott för dödvolum i tråg.
- RSB och TWB2 är förpackade i liknande rör. Läs varje etikett noggrant före användning.

Centrifugering

- Centrifugera endast vid angivna steg i proceduren för att konsolidera vätska eller kulor i botten av brunnen för att förhindra provförlust.

Hantera magnetkulor

- Frys dem inte Cleanup Beads (CB).

- Vid tvättning av magnetkulor:
 - Använd Magnetic Stand-96 för alla MIDI-plattor.
 - Dispensera vätska så att inga kulor förblir fästa på sidan av brunnen.
 - Låt plattan vara kvar på det magnetiska stativet.
- Tillsätt alltid reagenser i mitten eller botten av brunnen utan att rubba kulpelleten. Tillsätt inte reagenser överst på brunnen.
- Pipettera kulsuspensioner långsamt.
- Vortexblanda kulorna tills de är väl utspridda. Färgen på vätskan måste se homogen ut. Vortexblanda när det specificeras i protokollet för att säkerställa att kulorna resuspenderas vid användningstillfället.
- Om kulorna inte resuspenderas ska du skaka igen.
- Om magnetkulorna aspireras in i pipettspetsarna när de inte avses göra det, dispensera reaktioner tillbaka till plattan på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (cirka två minuter).
- Förvara upprätt för att säkerställa att kulorna är nedsänkta i bufferten när de återförs till förvaring efter användning.

Kontroller

TruSight Whole Genome använder analytiska kontroller inbyggda i TruSight Whole Genome Analysis Application-programvaran för datakvalificering och kräver inte användning av externa batchkontroller. Se [Kvalitetskontroller på sidan 31](#) för mer information om mätvärdesspecifikationer.

Bruksanvisning

Arbetsflöde för TruSight Whole Genome Dx Library Prep

Följande diagram illustrerar TruSight Whole Genome Dx Library Prep-arbetsflödet. Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade.

Om du stoppar ska du returnera återstående reagenser i originalrören till förvaringstemperaturen som anges i [Reagenser som tillhandahålls på sidan 5](#). Om du fortsätter ska du gå till nästa avsnitt i protokollet med de beredda reagenserna.



Batchplanering och skapande av körning

Planera antalet provbibliotek för batchen samt indexering och pooling för sekvenseringskörningar.

TruSight Whole Genome har utvärderats och prestanda har visats för fyra uppsättningar index för S2-flödescellen ([Figur 1, Tabell 4](#)) och två uppsättningar index för S4-flödescellen ([Figur 2, Tabell 5](#)).

Programvaran framtvingar användning av specificerade indexuppsättningar. Blanda inte mellan specificerade indexuppsättningar.

Sekvenseringsplexitet utanför dessa rekommendationer stöds inte.

S2-index och S4-indexuppsättningar stöder tillsammans biblioteksprepareringsbatchstorlekar på 6, 12, 16, 18, 22 och 24 prover. Använd de kompatibla indexuppsättningarna som anges i [Tabell 3](#) för varje biblioteksprepareringsbatchstorlek.



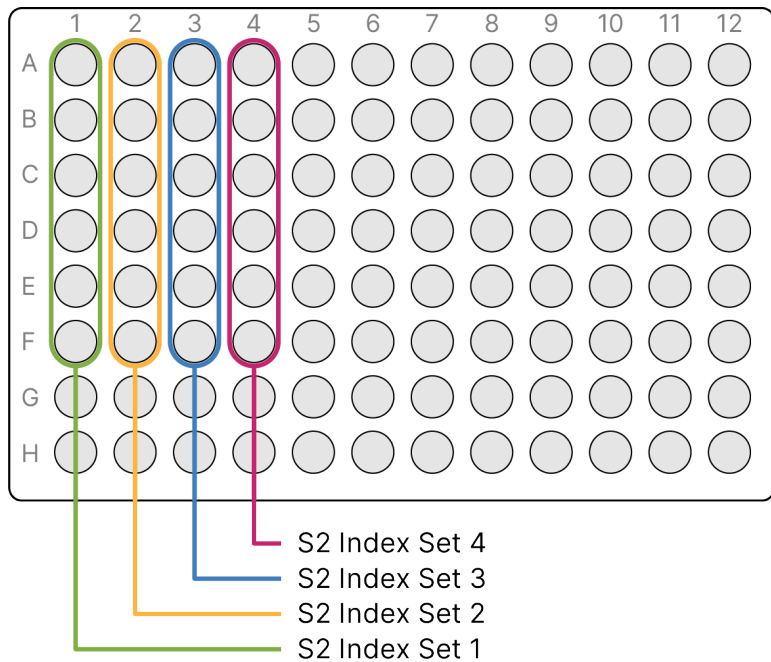
FÖRSIKTIGHET

Arrangera prover i plattan med en orientering som matchar den planerade indexeringen, dvs. rad A till H för ett 16-plex eller rad A till F för ett 6-plex. Lägg till index med en flerkanalspipett för att undvika att hoppa över en brunn eller lägga till två indexuppsättningar till ett enda prov, vilket kan orsaka uteblivet resultat respektive falska resultat.

Tabell 3 Alternativ för indexuppsättning för biblioteksprepareringsbatch

Batchstorlek för bibliotekspreparering	Indexuppsättning	Flödescellskonfigurationer
6 prover	S2 indexuppsättning 1, 2, 3 eller 4 (välj valfri 1 uppsättning)	S2 x 1
12 prover	S2 indexuppsättning 1, 2, 3 eller 4 (välj valfria 2 uppsättningar)	S2 x 2
18 prover	S2 indexuppsättning 1, 2, 3 eller 4 (välj valfria 3 uppsättningar)	S2 x 3
24 prover	S2 indexuppsättning 1, 2, 3 och 4	S2 x 4
16 prover	S4 indexuppsättning 1 eller 2	S4 x 1
22 prover	S4 indexuppsättning 1 + S2 indexuppsättning 3 eller 4	S4 x 1 och S2 x 1
	S4 indexuppsättning 2 + S2 indexuppsättning 1 eller 2	

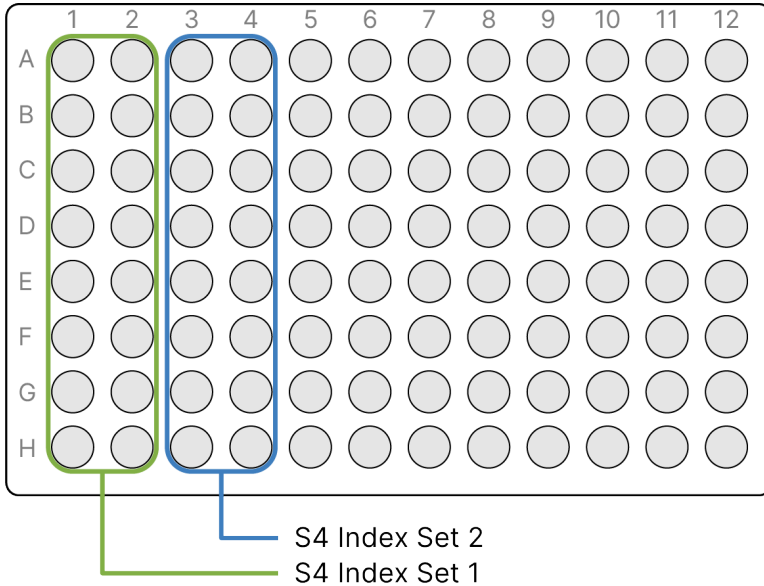
Figur 1 Indexplattlayout som visar fyra indexuppsättningar för S2-flödescellssekvensering



Tabell 4 S2-indexuppsättningar för S2-flödescell

	S2 Indexuppsättning 1 (grön)	S2 indexuppsättning 2 (gul)	S2 Indexuppsättning 3 (blå)	S2 indexuppsättning 4 (magenta)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Figur 2 Indexplattlayout som visar två indexuppsättningar för S4-flödescellssekvensering



Tabell 5 S4-indexuppsättningar för S4-flödescell

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

Registrera unikt batchnamn och provdata, inklusive prov-ID, tillhörande indexplattbrunns-ID (se [Bilaga A på sidan 87](#)), biblioteksplatta, biblioteksplattbrunns-ID och biblioteksrörs-ID (om känt). Denna information anges när körningen skapas.

För instruktioner om hur du använder applikationen för att skapa körningar ska du se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931). Registrera Run Name (körningsnamn) som ska användas vid laddning av förbrukningsartiklar.

⚠ FÖRSIKTIGHET

Se till att indexen och tillhörande prover som används under biblioteksprepareringen stämmer överens med de som registrerats och använts för Create Run (skapa körning). Avvikelser kan orsaka rapportering av felaktiga resultat eller uteblivna resultat.

Förbered för protokoll

Förbered reagenser och utrustning

Om du planerar att sekvensera samma dag ska du tina upp förbrukningsmaterial för sekvensering i förväg. Se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105) för detaljerade instruktioner.

1. Förvärm mikroprovskubator med en MIDI-plattinsats till 47 °C.
2. Ta ut följande reagenser ur kartongen och tina enligt följande.

Tabell 6 Förvaring vid -25 °C till -15 °C

Reagens	Kartongens namn	Tiningsanvisningar
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter. Förvara sedan på is tills det behövs.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.
UD-index	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.

Tabell 7 Förvaring vid 15 °C till 30 °C

Reagens	Kartongens namn	Tiningsanvisningar
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Använd i rumstemperatur.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Använd i rumstemperatur.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Använd i rumstemperatur.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Använd i rumstemperatur.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Använd i rumstemperatur.



FÖRSIKTIGHET

Denna uppsättning reagenser innehåller potentiellt 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. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS på support.illumina.com/sds.html.

Förbered DNA-prover

Förbered följande förbrukningsmaterial.

- Kvantifierade gDNA-prover:
 - a. Värm till rumstemperatur.
 - b. Centrifugera kort för att samla droppar.
 - c. Pulsvortexblanda eller pipettera för att blanda och centrifugera sedan kortvarigt.
- RSB—Vortexblanda eller invertera för att blanda. Förvara i rumstemperatur.
 - RSB och TWB2 är förpackade i liknande rör. Läs varje etikett noggrant före användning.

Förfarande

Beroende på DNA-inmatningen, som varierar beroende på den DNA-kvantifieringsmetod som används, ska du beräkna de volymer som krävs för att bereda utspädda DNA-prover. Formler tillhandahålls nedan för de tre testade DNA-kvantifieringsmetoderna. Se [Rekommendationer DNA-inmatning på sidan 10](#) och [Bilaga B på sidan 90](#) för mer information.

Beräkningarna förutsätter en minsta pipetteringsvolym på 2,0 µl och inkluderar 10 % överskott. Avrundning ska utföras i de sista stegen, efter att beräkningarna har slutförts, med det antal decimaler som krävs för att säkerställa korrekt pipettering.

Alternativ 1: 280 ng DNA-inmatning för Quant och Qubit Broad Range kvantifieringsmetoder

Minsta DNA-stamkoncentration för provet är 11,2 ng/µl. Prover < 11,2 ng/µl är mer benägna att underkännas i QC-kontroll av bibliotek efter sekvensering. Beroende på koncentrationen av DNA-stam ska du använda en av ekvationerna nedan för att utföra beräkningar.

1. För DNA-stamkoncentration 11,2 till 154,0 ng/µl ska du beräkna volymen av DNA-stammen och RSB som behövs med en total volym av utspädd DNA på 27,5 µl (25 µl plus 10 % överskott) som konstant:
 - a. Beräkna volymen DNA-stam:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Inmatnings-DNA-mål (ng)} + 10\% \text{ överskott})}{\text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l})} \\
 &= 280 \text{ ng} \times 1.1 / \text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \\
 &= 308 \text{ ng} / \text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- b. Beräkna volymen RSB-stam:

$$\begin{aligned}
 \text{RSB-volym } (\mu\text{l}) &= \text{Total volym utspädd DNA } (\mu\text{l}) - \text{Beräknad DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) \\
 &= 27.5 (\mu\text{l}) - \text{Beräknad DNA-stamvolym } (\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- c. Verifiera beräkningar: Bekräfta den beräknade DNA-stamvolymen (µl) + den beräknade volymen av RSB (µl) = 27,5 µl, den totala volymen utspädd DNA (en konstant, 25 µl plus 10 % överskott).

2. Alternativt kan du för DNA-stamkoncentrationer > 154,0 ng/μl beräkna den totala volymen utspädd DNA och RSB som behövs när DNA-stamvolymen 2,0 μl och målkoncentration för utspädd DNA 11,2 ng/μl används som konstanter.

- a. Beräkna den totala volymen utspädd DNA:

$$\begin{aligned} \text{Total volym utspädd DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \times \text{volym DNA-stam } (\mu\text{l})}{\text{Målutspädd DNA-stamkoncentration}} \\ &= \text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \times 2.0 \mu\text{l} / 11.2 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

- b. Beräkna volymen RSB:

$$\begin{aligned} \text{RSB-volym } (\mu\text{l}) &= \text{Beräknad total volym utspädd DNA } (\mu\text{l}) - \text{Beräknad DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Beräknad total volym av spädd DNA } (\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Verifiera beräkningar: Bekräfta den beräknade totala volymen spädd DNA (μl) - den beräknade volymen av RSB (μl) = 2,0 μl, DNA-stamvolymen (en konstant).

Fortsätt till steg 3 nedan.

Alternativ 2: 350 ng DNA-inmatning för Accuclear Ultra High Sensitivity kvantifieringsmetod

Minsta DNA-stamkoncentration för provet är 14,0 ng/μl. Prover < 14,0 ng/μl är mer benägna att underkännas i QC-kontroll av bibliotek efter sekvensering. Beroende på koncentrationen av DNA-stam ska du använda en av ekvationerna nedan för att utföra beräkningar.

1. För DNA-stamkoncentration 14,0 till 192,5 ng/μl ska du beräkna volymen av DNA-stammen och RSB som behövs med en total volym av utspädd DNA på 27,5 μl (25 μl plus 10 % överskott) som konstant:

- a. Beräkna volymen DNA-stam:

$$\begin{aligned} \text{DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{Inmatnings-DNA-mål (ng)} + 10\% \text{ överskott})}{\text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1.1 / \text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Beräkna volymen RSB-stam:

$$\text{RSB-volym } (\mu\text{l}) = \text{Total volym utspädd DNA } (\mu\text{l}) - \text{beräknad DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) = 27,5 (\mu\text{l}) - \text{beräknad DNA-stamvolym } (\mu\text{l})$$

- c. Verifiera beräkningar: Bekräfta den beräknade DNA-stamvolymen (μl) + den beräknade volymen av RSB (μl) = 27,5 μl, den totala volymen utspädd DNA (en konstant, 25 μl plus 10 % överskott).

2. Alternativt kan du för DNA-stamkoncentrationer > 192,5 ng/μl beräkna den totala volymen utspädd DNA och RSB som behövs när DNA-stamvolymen 2,0 μl används som en konstant.

- a. Beräkna den totala volymen utspädd DNA:

$$\text{Total volym utspädd DNA } (\mu\text{l}) = \frac{\text{DNA-stamkoncentration (ng}/\mu\text{l}) \times 2.0 \mu\text{l}}{14.0 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

- b. Beräkna volymen RSB:

$$\begin{aligned} \text{RSB-volym } (\mu\text{l}) &= \text{Total volym utspätt DNA } (\mu\text{l}) - \text{DNA-stamvolym } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Total volym } (\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Verifiera beräkningar: Bekräfta den beräknade totala volymen spädd DNA (μl) - den beräknade volymen av RSB (μl) = 2,0 μl , DNA-stamvolymen (en konstant).
3. Märk ett nytt 0,5 ml mikrocentrifugrör för varje utspätt prov.
4. Lägg till volymen RSB som beräknats ovan till respektive rör för varje utspätt prov.
5. Lägg till volymen DNA-stam som beräknats ovan till respektive rör för varje utspätt prov.
6. Puls vortexblanda och centrifugera sedan kort.

Bibliotekspreparering

Använd beredningsstegen i detta avsnitt för att förbereda reagenser i förväg.

Fortsätt direkt till nästa steg om en säker stoppunkt inte har specificerats.

Beredning

Förbered följande förbrukningsmaterial:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Vortexblanda. Om flera rör används ska du vortexblanda för att blanda och kombinera sedan.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Vortexblanda.
 - b. Centrifugera kort.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Kontrollera om det förekommer fällning. Om fällningar observeras ska du värma den till 37 °C i tio minuter och sedan vortexblanda tills fällningarna löses upp.
 - b. Vortexblanda ordentligt och centrifugera sedan kort.
- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Blanda genom att vända på flaskan. Vortexblanda inte.
 - b. Förvara på is till användning.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - b. Förvara i rumstemperatur.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - b. Förvara i rumstemperatur.
- CB (Cleanup Beads):

- a. Vortexblanda 1 minut.
- b. Vänd upp och ned 2–5 gånger och vortexblanda sedan ordentligt för att resuspendera.
- Indexadapterar (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
 - b. Förvara i rumstemperatur.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Märk rörets lock TWB2.
 - b. Vänd ordentligt för att blanda.
- I ett mikrocentrifugrör märkt 0,2N NaOH ska du kombinera följande volymer för att förbereda 0,2N NaOH enligt planerad satsstorlek. Vortexblanda.

OBS! Om du planerar att poola och denaturera bibliotek samma dag ska du förbereda ytterligare 0,2N NaOH. Se [Beredning på sidan 29](#).

Reagens	6 prover (µl)	12 prover (µl)	16 prover (µl)	18 prover (µl)	22 prover (µl)	24 prover (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1 080

- I ett 15 ml koniskt rör ska du kombinera följande volymer för att bereda 80 % EtOH enligt planerad satsstorlek. Överskott för tråganvändning ingår. Vortexblanda.

Reagens	6 prover (ml)	12 prover (ml)	16 prover (ml)	18 prover (ml)	22 prover (ml)	24 prover (ml)
100 % etanol, ren (200 proof)	4	8	8	12	12	12
Nukleasfritt vatten	1	2	2	3	3	3



FÖRSIKTIGHET

Denna uppsättning reagenser innehåller potentiellt 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. För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se SDS på support.illumina.com/sds.html.

Tagmentera genomiskt DNA

Det här steget använder Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) för att tagmentera DNA, vilket är en process som fragmenterar och taggar DNA:t med adaptersekvenser.

Förbrukningsmaterial

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

Förfarande

1. Bekräfta att mikroprovinkubatorn med MIDI-plattans insats är förvärmad till 47 °C.
2. Märk en ny MIDI-platta med 96 brunnar med LP1 (Library Plate 1).
3. Ange och registrera provbrunns-ID för tagmentering av utspädda DNA-prover och reagenser.
4. Överför 25 µl utspätt DNA-prov till varje brunn.
5. Tillsätt 10 µl TB1 till varje brunn.
6. Vortexblanda BLT-PF kraftigt i 1 minut för att återsuspendera. Centrifugera inte. Upprepa vid behov.
7. Tillsätt 15 µl BLT-PF till varje brunn.
8. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut.
9. Inkubera LP1 i den förvärmade mikroprovinkubatorn vid 47 °C i 8 minuter.

OBS! Lätt kondens på plattförseglingen förväntas. Centrifugera inte.

10. Ta bort förseglingen och tillsätt 10 µl ST2 till varje brunn.
11. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut och fortsätt sedan till nästa steg.

Rengöring efter tagmentering

Följande steg sköljer bort obundet DNA och utför buffertutbyte för att förbereda för nästa steg.

Förbrukningsmaterial

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Tråg

Om reagens

- Pipettera TWB2 långsamt för att minimera skumbildning.
- RSB och TWB2 är förpackade i liknande rör. Läs varje etikett noggrant före användning.

Förfarande

1. Ta bort förseglingen och placera LP1 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (2 minuter).

- Förbered TWB2-tråg med volymer enligt följande tabell och märk tydligt tråget med TWB2. Volymerna inkluderar 1 ml överskott för dödvolum i tråg. Behåll tråg för senare steg.

Reagens	6 prover (µl)	12 prover (µl)	16 prover (µl)	18 prover (µl)	22 prover (µl)	24 prover (µl)
TWB2	3 700	6 400	8 200	9 100	10 900	11 800

- Medan LP1 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalspipett inställd på 60 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
- Använd en flerkanalspipett och tillsätt 150 µl TWB2 till varje brunn.
- Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut.
- Ta bort förseglingen och placera LP1 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (2 minuter).
- Sätt tillbaka BLT-PF i frysförvaring under inkubation och fortsätt sedan till nästa steg.

Ligatindex

I detta avsnitt ligger användarna de unika dubbla indexadaptrarna till varje prov enligt indexering som planeras under [Batchplanering och skapande av körning på sidan 15](#).

Förbrukningsmaterial

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Indexadaptrar (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) tråg
- 0,2N NaOH (Spädd HP3)

Om reagens

- Indexplattans brunnar kan inte återanvändas.
- Aspirera och dispensera ELM långsamt på grund av lösningens viskositet.
- RSB och TWB2 är förpackade i liknande rör. Läs varje etikett noggrant före användning.

Förfarande

- Förvara LP1 på det magnetiska stativet och utför följande steg:
 - Använd en flerkanalspipett inställd på 150 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn.
 - Utan att rubba kulpelleten ska du använda en 20 µl pipett för att avlägsna och kassera överbliven TWB2 från varje brunn.
 - Tillsätt 45 µl ELM till varje brunn.
 - Genomborra folieförseglingen på indexadapterplattan för var och en av de planerade indexbrunnarna med en P200 flerkanalspipett och nya pipettspetsar. Använd en ny pipettspets för varje brunn för att undvika kontaminering.

- e. Tillsätt 5 µl indexadapter till motsvarande provbrunnar i LP1 enligt index som valts under batchplanering med en P-10 eller P-20 flerkanalpipett.
2. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut.
3. Inkubera LP1 i den förvärmade mikroprovskubatorn vid 47 °C i 8 minuter.

OBS! Lätt kondens på plattförseglingen förväntas. Centrifugera inte.

4. Sätt tillbaka ELM i frysförvaring under inkubation.
5. Ta bort förseglingen och placera LP1 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (2 minuter).
6. Medan LP1 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalpipett inställd på 50 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
7. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
 - a. Tillsätt 150 µl TWB2 på kulorna i varje brunn med en flerkanalpipett.
 - b. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut.
 - c. Ta bort förseglingen och placera LP1 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (2 minuter).
 - d. Medan LP1 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalpipett inställd på 150 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
8. Tvätta kulorna en **andra** gång.
9. Medan LP1 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalpipett inställd på 20 µl för att avlägsna och kassera all överbliven TWB2 från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
10. Tillsätt 45 µl av tidigare beredd 0,2N NaOH i varje brunn.
11. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i 1 minut och fortsätt sedan till nästa avsnitt.

Storleksval och rengöringsbibliotek

Detta steg använder ett dubbelsidigt storleksval av bibliotek. I det första steget läggs Cleanup Beads till de eluerade biblioteken och BLT-PF-kulorna. Supernatanten som innehåller det eluerade enkelsträngade biblioteket överförs sedan till en ny platta medan fragment som är för stora blir kvar. I det andra steget läggs Cleanup Beads till de överförda biblioteken och fragment som är för små tas bort. Sedan elueras biblioteken och överförs till den slutliga biblioteksplattan (FLP).

Förbrukningsmaterial

- MIDI-platta med 96 brunnar
- Tråg (3)
- PCR-platta
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)

- Nyberedd 80-procentig etanol (80 % EtOH)

Beredning

1. Vortexblanda CB och vänd sedan tills den är helt resuspenderad.
2. Förbered CB-tråg med volymer enligt följande tabell och märk tråg CB. Volymerna är tillräckliga för båda tillsatsstegen och inkluderar 1 ml överskott i tråget för trågets dödvolum. Det finns ingen anledning att blanda mellan CB-tillsatsstegen. Kulorna förblir utspridda under hela proceduren.

Reagens	6 prover (µl)	12 prover (µl)	16 prover (µl)	18 prover (µl)	22 prover (µl)	24 prover (µl)
CB	1 480	1 960	2 280	2 440	2 760	2 920

Förfarande

1. Ta bort förseglingen och tillsätt 40 µl CB till brunnarna på MIDI-plattan LP1 som innehåller BLT-PF och 0,2N NaOH.
2. Försegla och skaka LP1 vid 1 800 rpm i en minut.
3. Inkubera LP1 vid sidan av magnetiskt stativ i rumstemperatur i 2 minuter.
4. Ta bort förseglingen och placera LP1 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (5 minuter).
5. Märk en ny MIDI-platta LP2 med 96 brunnar medan plattan inkuberas.
6. Överför 80 µl supernatant från LP1 på det magnetiska stativet till motsvarande brunnar med LP2 med en flerkanalspipett.
7. Tillsätt 40 µl CB till varje brunn på MIDI-plattan LP2.
8. Försegla och skaka LP2 vid 1 800 rpm i en minut.
9. Kassera MIDI-plattan LP1.
10. Inkubera LP2 vid sidan av magnetiskt stativ i rumstemperatur i 2 minuter.
11. Ta bort förseglingen och placera LP2 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (5 minuter).
12. Medan LP2 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalspipett inställd på 120 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
13. Häll tidigare beredd 80 % EtOH i ett märkt tråg och tvätta kulorna med LP2 på magnet enligt följande.
 - a. Tillsätt 180 µl 80 % EtOH med en flerkanalspipett.
 - b. Vänta i 30 sekunder.
 - c. Använd en flerkanalspipett inställd på 180 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
14. Tvätta kulorna en **andra** gång.
15. Medan LP2 befinner sig på det magnetiska stativet ska du använda en flerkanalspipett inställd på 20 µl för att avlägsna och kassera all överbliven EtOH från varje brunn utan att rubba kulpelleten.
16. Låt LP2 vara kvar på det magnetiska stativet i 4 minuter för att lufttorka.

17. Kassera oanvänd 80 % EtOH och tråg.
18. Förbered RSB-tråg med volymer enligt följande tabell och märk tråg RSB. Volymerna inkluderar 1 ml överskott för dödvolum i tråg.

Reagens	6 prover (µl)	12 prover (µl)	16 prover (µl)	18 prover (µl)	22 prover (µl)	24 prover (µl)
RSB	1 390	1 780	2 040	2 170	2 430	2 560

19. Tillsätt 65 µl RSB på kulorna i varje brunn.
20. Försegla och skaka LP2 vid 1 800 rpm i en minut.
21. Inkubera LP2 i rumstemperatur i 2 minuter.
22. Ta bort förseglingen och placera LP2 på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (2 minuter).
23. Märk en ny PCR-platta FLP (slutlig biblioteksplatta) och med batchnamnet som användes när körningen skapades.
24. *Överför* 60 µl supernatant från LP2 på det magnetiska stativet till motsvarande brunnar med FLP med en flerkanalspipett.



FÖRSIKTIGHET

Supernatant innehåller det slutliga biblioteket och kommer att användas under pool- och denatureringssteget. Kassera inte.

25. Kassera alla tråg tillsammans med oanvända reagenser i tråg.
26. Kassera MIDI-plattan LP2.

SÄKER STOPPUNKT

Vid stopp ska du försegla den slutliga biblioteksplattan (FLP) med Microseal B och förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till 14 dagar.

Samla och denaturera bibliotek

I det här avsnittet skapar användare pooler som planeras i [Batchplanering och skapande av körning på sidan 15](#) och späder och denaturerar.

Förbrukningsmaterial

- HP3 (2N NaOH), eller 0,2N NaOH om beredd på samma dag – vortexblanda och centrifugera sedan kort.
- NB (Neutralization Buffer) – Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
- RSB (Resuspension Buffer) – Vortexblanda eller vänd för att blanda.
- Mikrocentrifugrör (1 för reagensberedning och 1 för varje planerad bibliotekspool)
- NovaSeq 6000Dx Biblioteksror (PN 20062290 eller PN 20062291) (1 rör för varje planerad bibliotekspool)

Beredning

1. Kombiner följande volymer i ett mikrocentrifugrör för att bereda 0,2N NaOH. Märk röret 0,2N NaOH. Om ytterligare 0,2N NaOH beredd under biblioteksprepareringen och protokollet utförs samma dag ska du hoppa över detta steg.

För att förhindra små pipetteringsfel bereds extra volym.

Reagens	Volym för vardera S2-flödescell (µl)	Volym för vardera S4-flödescell (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.

Förfarande

1. Preparera biblioteksplattan enligt följande om FLP-plattan har förvarats fryst. Gå annars vidare till steg 2.
FLP-platta:
 - a. Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.
 - b. Centrifugera vid 1 000 × g i en minut.
 - c. Ta bort förseglingen från FLP.
 - d. Pipettblanda 5 till 10 gånger med en flerkanalspipett inställd på 30 µl.
 - e. Försegla och centrifugera vid 1 000 × g i en minut.
2. Välj ett av följande alternativ för att poola, denaturera och späda ut biblioteken för varje uppsättning med 6 eller 16 prover som planeras för sekvensering.

Alternativ 1 Sekvensera 6 bibliotek på S2-flödescell.

- a. För varje bibliotekspool ska du märka ett nytt mikrocentrifugrör med poolnamnet, till exempel poolade bibliotek (PL) 1, 2, 3, osv.
- b. Ta bort förseglingen och överför 25 µl av varje DNA-bibliotek med streckkod från en given S2-indexuppsättning från FLP-plattan till PL-röret för varje motsvarande planerad körning enligt de sekvenseringspooler som planeras under [Batchplanering och skapande av körning på sidan 15](#). Kombinera till exempel bibliotek som preparerats med S2 indexuppsättning 1 i PL-röret.
- c. Applicera självhäftande plattförsegling på FLP-plattan och sätt tillbaka för förvaring.
- d. Tillsätt 37 µl 0,2N NaOH till varje PL-rör.
- e. Vortexblanda varje PL-rör för att blanda. Centrifugera kort.
- f. Inkubera vardera PL-rör i rumstemperatur i 8 minuter.
- g. Tillsätt 38 µl NB till varje PL-rör.
- h. Vortexblanda varje PL-rör för att blanda. Centrifugera kort.
- i. Överför 225 µl av det denaturerade, utspädda biblioteket till ett rent NovaSeq 6000Dx-biblioteksrör.

**FÖRSIKTIGHET**

Om det tidigare angetts kommer NovaSeq 6000Dx-biblioteksror-ID att användas för att identifiera och associera den planerade körningen. Kontrollera att det biblioteksror-ID som poolen överförs till är samma biblioteksror-ID som anges i Create Run (Skapa körning), annars kan en felaktig associering av provresultat inträffa. Om biblioteksror-ID specificeras i planerad körning ska du bekräfta att rätt rör används. Om det inte tidigare specificerats ska du registrera det biblioteksror-ID som använts och revidera den planerade körningen, annars måste associerad planerad körning(ar) väljas manuellt när instrumentet laddas med användning av körningsnamnet.

Alternativ 2 Sekvensera 16 bibliotek på S4-flödescell.

- a. Märk ett nytt mikrocentrifugrör med poolnamnet, till exempel poolade bibliotek (PL) 1, 2, 3, osv.
- b. Ta bort förseglingen och överför 18 µl av varje DNA-bibliotek från FLP-plattan till PL-röret enligt de sekvenseringspooler som planeras under *Batchplanering och skapande av körning på sidan 15*. Kombiner till exempel bibliotek med S4 indexuppsättning 1 i PL-röret.
- c. Applicera självhäftande plattförsegling på FLP-plattan och sätt tillbaka för förvaring.
- d. Tillsätt 22 µl RSB till PL-röret.
- e. Tillsätt 77 µl 0,2N NaOH till PL-röret.
- f. Vortexblanda PL-röret för att blanda. Centrifugera kort.
- g. Inkubera PL-rör i rumstemperatur i 8 minuter.
- h. Tillsätt 78 µl NB-buffert till PL-röret.
- i. Vortexblanda PL-röret för att blanda. Centrifugera kort.
- j. Överför 465 µl av det denaturerade, utspädda biblioteket till ett rent NovaSeq 6000Dx-biblioteksror.

**FÖRSIKTIGHET**

Om det tidigare angetts kommer NovaSeq 6000Dx-biblioteksror-ID att användas för att identifiera och associera den planerade körningen. Kontrollera att det biblioteksror-ID som poolen överförs till är samma biblioteksror-ID som anges i Create Run (Skapa körning), annars kan en felaktig associering av provresultat inträffa. Om biblioteksror-ID specificeras i planerad körning ska du bekräfta att rätt rör används. Om det inte tidigare specificerats ska du registrera det biblioteksror-ID som använts och revidera den planerade körningen, annars måste associerad planerad körning(ar) väljas manuellt när instrumentet laddas med användning av körningsnamnet.

3. Fortsätt direkt till sekvensering om du planerar att starta körningen samma dag.

SÄKER STOPPUNKT

Vid stopp, fäst NovaSeq 6000Dx-biblioteksroret och förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar.

Beredning för sekvensering

1. Följ beredningsinstruktionerna i Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105) för förbrukningsmaterial i satsen som planeras för sekvensering.

2. Om NovaSeq 6000Dx-biblioteksröret med poolat bibliotek förvarades fryst ska du bereda enligt följande. Om du fortsätter direkt från föregående avsnitt ska du gå till [3](#).
 - a. Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.
 - b. Ta bort locket och pipettera försiktigt blandningen fem gånger med en P1000-pipett inställd på 300 µl för S4-flödescellbibliotekspoolen eller en P200-pipett inställd på 145 µl för S2-flödescellbibliotekspoolen.
 - c. Sätt på locket på NovaSeq 6000Dx-biblioteksröret och skaka eventuella droppar till botten för hand. Vortexblanda eller centrifugera inte.
3. Ladda förbrukningsmaterial. Se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105) för mer information.

Tolkning av resultat

TruSight Whole Genome är utformad för att sekvensera hela det mänskliga genomet. Varianter rapporteras för prover som klarar analytiska kvalitetskontroller (QC) för användning med nedströms tertiära applikationer för könscellsanalys.

- Ett sekvenserings-, FASTQ- eller provkvalitetsresultat anses vara giltigt endast om kvalitetsmåttet uppfyller eller överskrider den definierade specifikationen. Om kvalitetsmåttet ligger under den definierade specifikationen rapporteras prestandan som UNDERKÄNT och provet måste upprepas. För information om specifikationerna för kvalitetsmätvärden som används för att fastställa provets giltighet ska du se [Kvalitetskontroller på sidan 31](#).
- Prover som klarar alla kvalitetströsklar förväntas ge variantbestämningsprestanda som beskrivs i noggrannhetsstudien (se [Noggrannhet på sidan 42](#)).
- Små varianter annoteras som hög, mellanliggande eller låg konfidens baserat på varje varianttyps förväntade prestanda (se [Bestämning av konfidensnivå för små varianter på sidan 38](#)).
- Tolkning av all variantinformation måste valideras av laboratoriet med hjälp av de tillhandahållna analysutdatafilerna. Se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931) för en beskrivning av informationen i utdatafilerna.

Kvalitetskontroller

Sekvenseringskörningen och provets validitet fastställs automatiskt med hjälp av analytiska kontroller och rapporteras av TruSight Whole Genome Analysis Application (se [Tabell 8](#) för ytterligare information om mätspecifikationerna för kvalitetskontrollen). TruSight Whole Genome kräver inte användning av externa positiva kontroller.

- QC-resultaten rapporteras i en konsoliderad rapport, för alla prover i en körning, och i enskilda QC-rapporter för prov. Rapporterna matas ut av programvaran till analysmappen. Se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931) för platsen för analysmappen samt körningsmappen.

- Fel i specifikationen för kvalitetskontroll av sekvenseringskörning ogiltigförklarar sekvenseringskörningen och stoppar ytterligare analys.
- Någon underkänd provspecifikation för FASTQ eller bibliotek ogiltigförklarar provbiblioteket och förhindrar utmatning av tillhörande CRAM- eller VCF-filer.
- Ytterligare kvalitetskontrollmätningar kan gälla i enlighet med lokala, nationella och/eller federala föreskrifter eller ackrediteringskrav.

Mer information om att upprepa sekvenseringskörningar eller bibliotekspreparering finns i [Felsökning på sidan 71](#).

Tabell 8 TruSight Whole Genome Beskrivningar av mätvärdesspecifikationer för kvalitetskontroll

	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning
QC för sekvenseringskörning	Totalt % \geq Q30	≥ 85	Mätning av baskvalitet på körnivå. Minsta specifikation ställs in eftersom för låga %Q30-körningar inte klarar Q30-baser i provbibliotekets kvalitetskontroll.
QC för FASTQ	Utbyte per prov (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$	Minimum är inställt på att vara lika med ca 26x genomsnittlig autosomal täckning för triage-prover som inte godkänns i bibliotekets QC för att minska analystiden.

	Mätvärde	Specifikation	Beskrivning
QC för biblioteksprov	Genomsnittlig autosomal täckning	≥ 35	Genomsnittlig täckning över autosomerna. Minsta specifikation ställs in för att säkerställa analytisk prestanda.

Mätvärde	Specifikation	Beskrivning
Procentandel autosomer med mer än 20 x täckning	$\geq 93,94$	Mätning av täckningens enhetlighet som upptäcker problem som inte nödvändigtvis är relaterade till GC-bias. Minsta specifikation ställs in för att säkerställa analytisk prestanda.
Normaliserad täckning vid 60 % till 79 % GC-grupper	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Mätning av täckningsjämnhet som detekterar GC-bias, specifikt en förlust av täckning i områden av genomet med högre % GC och lägre % AT-bassammansättning. Minsta och maximala specifikationer ställs in för att säkerställa analytisk prestanda.
Normaliserad täckning vid 20 % till 39 % GC-grupper	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Mätning av täckningsjämnhet som detekterar GC-bias, specifikt en förlust av täckning i områden av genomet med lägre % GC och högre % AT-bassammansättning. Minsta och maximala specifikationer ställs in för att säkerställa analytisk prestanda.
Genomsnittlig mitokondriell täckning	≥ 500	Täckning av mitokondriell kromosom. Minsta specifikation ställs in för att säkerställa detektionsgränsen för mitokondriell SNV.
Procent Q30-baser	≥ 85	Mätning av baskvalitet. Minsta specifikation ställs in för att säkerställa analytisk prestanda.
Uppskattad provkontaminering	$\leq 0,005$	Detekterar kontaminerande avläsningar från andra prover. Maximal specifikation ställs in för att säkerställa detektionsgränsen för mitokondriell SNV (varianttypen med högsta känslighet för kontaminering).

Prestandaegenskaper

Följande valideringsstudier utfördes med hjälp av TruSight Whole Genome-arbetsflödet som beskrivs i [Bruksanvisning på sidan 15](#) och utformades för att säkerställa analysstabilitet gentemot vanliga variationskällor och för att ge rekommendationer för konsekvent prestanda. Dessa studier använde de analytiska mätvärdesspecifikationerna för QC som beskrivs i [Tabell 8](#) som riktmärke för framgångsrik analysprestanda och som en förutsättning för att fastställa analytisk variantbestämningsprestanda.

Korskontaminering

Korskontamineringsstudien utvärderade felaktig detektion av indexavläsning på grund av kontaminering från brunn till brunn under förberedelse av provbibliotek och kontaminering från körning till körning mellan på varandra följande sekvenseringskörningar. 24 blodprover användes för att utvärdera korskontaminering. Totalt 24 bibliotek preparerades vardera av två operatörer med S2 konfigurationsindexuppsättningar 1–4, och poolade bibliotek sekvenserades i indexuppsättningsordning på en NovaSeq 6000Dx Instrument. 16 bibliotek vardera preparerades av två operatörer med användning av S4-konfigurationsindexuppsättningarna 1 och 2 i två replikat, och poolade bibliotek med alternerande indexuppsättningar sekvenserades på samma NovaSeq 6000Dx.

För att utvärdera korskontaminering jämfördes korrekta indexavläsningar med indexavläsningar från intilliggande brunnar för kontaminering från brunn till brunn och tidigare sekvenseringskörning för kontaminering från körning till körning. Mängden kontamination från körning till körning var $\leq 0,003178\%$ för S2 och $\leq 0,002487\%$ för S4-körningar. För att utvärdera prov-till-prov-kontaminering användes provbibliotekets QC-mätvärde för uppskattad provkontamination. Mängden prov-till-prov-kontaminering var 0,001, det lägsta värdet rapporterades av analysprogrammet. Dessa resultat indikerar att det finns låg risk för kontaminering inom arbetsflödena för bibliotekspreparering och sekvensering.

Stabilitet under användning och mellan användningar

Reagenser för bibliotekspreparering bedömdes för stabilitet under användning av sats, inklusive flera händelser med fruset-upptining och stabilitet för öppna rör.

För testning av frys-upptiningscykel utsattes de frysta komponenterna för fem frys-upptiningshändelser för att stödja en händelse för upppackning och fyra händelser för satsanvändning. För stabilitet under användning avlägsnades volymen som krävdes för att preparera sex provbibliotek vid var och en av tre frys-upptiningcyklerna för att simulera volymutarmning under användning, och komponenter förvarades i ytterligare 31 dagar före testning. Vid testning med gDNA extraherat från sex blodgivare, klarade alla data analysanalytiska kontrollmått. Dessa resultat indikerar att frysta biblioteksprepareringsreagenser kan användas med upp till fyra frys-upptiningcykler och 30 dagars stabilitet under användning.

Intermediär stabilitet bedömdes för de enskilda biblioteken och de poolade och denaturerade biblioteken. Alla data klarade analysanalytiska kontrollmått vilket indikerar upp till 14 dagars stabilitet för de enskilda biblioteken och upp till 30 dagars stabilitet för de poolade och denaturerade biblioteken vid frusen förvaring (-25 °C till -15 °C) enligt beskrivningen i de säkra stoppunkterna.

Blodprovstagnning och förvaring

Blodprovsrörskompatibilitet och förvaring av prover undersöktes med hjälp av fyra donatorer och blod som togs i EDTA-provtagningsrör från tre olika leverantörer. Genomiskt DNA (gDNA) extraherades från var och en vid ankomsten för tidpunkt noll och sedan igen efter att blodet sparats i 16, 33 och 43 dagars förvaring vid 2 °C till 8 °C. Det extraherade gDNA:t förvarades fryst (-25 °C till -15 °C) i elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) och kvantifierades och användes sedan för bibliotekspreparering och sekvensering. Alla data passerade analysanalytiska kontrollmått vilket indikerar analyskompatibilitet med tre olika EDTA-blodprovtagingsrör och blod som förvarats i upp till fem veckor vid 2 °C till 8 °C.

Utvärdering av DNA-extraktionsmetod

Tre kommersiellt tillgängliga extraktionssatser utvärderades med avseende på analysprestanda. Två satser använde magnetiska kulor, en med och en utan fast fas och cellulosebaserad bindning och en sats använde en kiseldioxidmembranbaserad nukleinsyrareningsmetod med spinnkolonner ([Tabell 9](#)).

Utvärderingen utfördes av två operatörer med ett parti med extraktionsreagenser per metod och helblod som tagits i EDTA-rör från fyra förmodat friska donatorer. Varje blodprov extraherades fyra separata gånger enligt tillverkarens instruktioner under icke-på varandra följande dagar för totalt 16 observationer per sats. Extraherat gDNA användes för att preparera bibliotek för sekvensering och analys.

Alla observationer (16/16) för varje extraktionsmetod godkändes enligt analysanalytiska kontrollmått. Analysens prestanda påverkades inte av valet av prov-gDNA-extraktionsmetod. Analytiska noggrannhets- och reproducerbarhetsstudier använde gDNA extraherat med sats 3 (kiselfilterkolonnisolering med spinnkolonner).

Tabell 9 Extraktionsmetoder testade för TruSight Whole Genome-prestanda

Sats	Extraheringsmetod
1	Magnetisk kuleextraktion med reversibel immobilisering i fast fas (SPRI)
2	Magnetisk kuleextraktion med mobil fast fas och cellulosebaserad bindning
3	Silikafilterkolonnisolering med spinnkolonner

Känslighet för DNA-inmatning

Mängden gDNA-inmatning som rekommenderas för testning per prov är 280 ng eller 350 ng beroende på DNA-kvantifieringsmetoderna som anges i [Rekommendationer DNA-inmatning på sidan 10](#).

För att fastställa prestanda över ett intervall av indatakoncentrationer för gDNA testades mängden DNA som användes i analysen vid nivåer som varierade med $\pm 28,6\%$ från den rekommenderade indatamängden. Resultaten visade att -25% av den rekommenderade gDNA-inmatningen är en lägre gräns för analysen. Analysen fungerar på lämpligt sätt med gDNA-inmatning upp till $+28,6\%$ av den rekommenderade inmatningen. Karakteriseringen av tre distinkta kvantifieringsmetoder visade att olika metoder har olika variabilitetsnivåer och kan ge olika resultat. Om du använder en annan metod än de som anges i [Rekommendationer DNA-inmatning på sidan 10](#) kan mål-gDNA-inmatningen behöva optimeras. Det rekommenderas att gDNA för prover avsedda för en viss biblioteksprepareringsbatch och sekvenseringskörning kvantifieras tillsammans för att eliminera variabilitet mellan batcher när så är möjligt, eller att processkontroller används för att säkerställa $\leq 25\%$ variabilitet mellan kvantifieringar mellan batcher.

Interfererande substanser

Denna studie utvärderade prestanda med både endogena och exogena substanser associerade med mänskligt blod och blodprovtagningrör. Bilirubin, hemoglobin och triglycerider valdes för utvärdering för att simulera ikteriska, hemolyserade respektive lipemiska prover. Biotin och EDTA valdes för utvärdering på grund av närvaro i blod- och blodprovtagningrör och för potentiell inverkan på analyskemin. Substanser spetsades i blodproverna från donatorn före extraktion antingen direkt eller efter upplösning i lösningsmedel. Testkoncentration och detaljer om spike-in (spetsningen) för varje substans finns i följande tabell.

Tabell 10 Interfererande ämnen testade för TruSight Whole Genome-prestanda

Ämne	Testkoncentration	Lösningsmedel som används i spetsningslösning	% spetsning tillsatt i blod
Bilirubin (okonjugerat)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4 %
Hemoglobin	1 000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	N/A (Ej tillämpligt) – löst i blod	N/A (Ej tillämpligt) – löst i blod
Triglycerider	1 500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100 % etanol	4 %
Biotin	0,00351 mg/ml ²	Vatten	4 %
EDTA	5,4 mg/ml ³	Vatten	3 %

¹ Koncentrationerna valdes för att vara de högsta observerade koncentrationerna enligt "Kompletterande tabeller för interferenstestning i klinisk kemi, CLSI EP37-ED1:2018".

² Koncentrationen valdes att vara tre gånger "Högsta läkemedelskoncentration under terapeutisk behandling" som anges i "Kompletterande tabeller för interferenstestning i klinisk kemi, CLSI EP37-ED1:2018".

³ Koncentrationen valdes baserat på EDTA-koncentrationen som varierar i blodprovtagningrör upp till 1,8 mg/ml och för att simulera en kort fyllnadshändelse med en blodprovstagning på 33 % av den nominella blodprovsvolymen, vilket leder till 3x högre EDTA-koncentration i blod motsvarande 5,4 mg/ml.

Blod från fyra donatorer användes vid testning. För varje interfererande substans spetsades en alikvot av helblod från varje donator med den interfererande substansen och delades sedan upp i fyra gDNA-extraktionsreplikater. En kontroll bearbetades på liknande sätt utan tillsats av substanser. De parade test- och

kontrollförhållandena bearbetades för varje donator inom samma extraktionshändelse, och det extraherade gDNA:t bearbetades sedan inom en enda bibliotekspreparerings- och sekvenseringshändelse. Det fanns ingen påverkan på analysprestanda och inga bevis för interferens som svar på någon av de testade substanserna.

Likvärdighet för provindexering

TruSight Whole Genome ger möjlighet att välja mellan fyra 6-plex indexuppsättningar för S2-körningar eller två 16-plex indexuppsättningar för S4-sekvenseringskörningskonfigurationer. Analysen visade sig ge likvärdig prestanda när bibliotek sekvenseras på antingen NovaSeq 6000Dx S2- eller S4-sekvenseringskörningskonfigurationerna. Dessutom visade sig både S2- och S4-körningskonfigurationerna uppnå > 95 % av provbiblioteken med minst 35,0x täckning när de testades med de föreskrivna indexuppsättningarna. Således kan olika indexuppsättningar och poolning som används för att sekvensera på S2- och S4-flödescellerna användas omväxlande för att ge skalbarhet för att tillgodose fluktuationer i provgenomströmning och ge flexibilitet i laboratorieprocesser.

Analysprestanda

Initiala karakteriseringsstudier utfördes för att fastställa konfidensnivåtrösklarna för små varianter, gränsen för blank/detektingsgräns för mitokondriella SNV:er och storlekströsklarna för korrekt detektion av STR-expansioner vid användning av TruSight Whole Genome-arbetsflödet. Prover som representerar variantklasserna som bedömdes av TruSight Whole Genome inkluderades i utvärderingen av analytisk noggrannhet och repeterbarhet, inklusive precision inom laboratoriet och extern reproducerbarhet. Analytisk prestanda rapporteras för sekvenseringskörningar och prover som klarade alla kvalitetskontroller, med undantag för de artificiella blandningsprover som användes för att bedöma mitokondriella SNV:er vid eller nära detektingsgränsen som inte uppfyllde kontamineringsmättet. Resultaten för var och en av dessa studier beskrivs i avsnitten nedan.

Inledande karakteriseringsstudier

Bestämning av konfidensnivå för små varianter

För denna studie användes en logistisk regressionsmodell på hög- och dåligt reproducerbara variantställen från 96 replikat av NA12878 för att definiera tröskelvärden för höga, medelhöga och låga konfidensnivåer.

Höga konfidensbaser för en viss varianttyp är de där förutspådd reproducerbarhet inom laboratoriet uppfyller eller överstiger 99 % för ett visst poängtröskelvärde och procentandelen icke-N-baser som uppfyller detta kriterium överstiger 30 %. Om en liten varianttyp inte har en poängtröskel som uppfyller dessa kriterier kommer den varianttypen inte att ha en hög konfidensnivå. Intermediära konfidensbaser är de där förutspådd reproducerbarhet inom laboratoriet uppfyller eller överstiger 95 % för en given poängtröskel och varianttyp. Låga konfidensbaser är de där förutspådd reproducerbarhet inom laboratoriet är under 95 % för en given poängtröskel och varianttyp. Variantbestämningar för en viss varianttyp med en hög eller mellanliggande

konfidensnivå inkluderar majoriteten av % icke-N-baserna (dvs. exklusive luckor) (se tabell 6) och uppvisar hög prestanda när de bedöms mot sanningsuppsättningar av små varianter och i omfattande bedömningar av precision inom laboratoriet för NA12878-repliket.

Varianttyp	Förtroendenivå	% icke-N baser
SNV	Hög	89,14 %
	Mellanliggande	3,30 %
	Låg	7,56 %
Korta deletioner (1–5 bp)	Hög	90,88 %
	Mellanliggande	2,45 %
	Låg	6,67 %
Mellanliggande deletioner (6–15 bp)	Mellanliggande	86,94 %
	Låg	13,06 %
Långa deletioner (≥ 16 bp)	Mellanliggande	85,42 %
	Låg	14,58 %
Korta insertioner (1–5 bp)	Hög	88,94 %
	Mellanliggande	4,61 %
	Låg	6,45 %
Mellanliggande insertioner (6–15 bp)	Mellanliggande	89,37 %
	Låg	10,63 %
Långa insertioner (≥ 16 bp)	Mellanliggande	48,92 %
	Låg	50,63 %

Mitokondriell SNV-gräns för blank/detektingsgräns

Studier av blankgräns (LoB) och detektingsgräns (LoD) utfördes för mitokondriella SNV:er. För den mitokondriella SNV-studien bedömdes LoB med användning av loci som man vet inte har någon variant (dvs. referensbestämning). LoD definieras som allelfrekvensen för mtDNA SNV-varianten för vilken detektionsfrekvensen för den varianten är 95 %.

För att fastställa LoB och LoD för detektion av heteroplasmiska mtSNV:er blandades grundligt karakteriserade gDNA-prover från två olika blodgivare i en titreringsstudie till fem spädningsnivåer med 20 replikat per spädningsnivå. Spädningsnivåerna utformades för att rikta in sig på procentandelar av mtSNV-varianter (1,2 – 6 % VAF) för att efterlikna olika nivåer av mitokondriell heteroplasm. Blandade gDNA-prover bearbetades och avläsningar nedsamlades för att uppnå 500x genomsnittlig mitokondriell täckning. Totalt 42 artificiella "heteroplasmiska" platser användes i nedströmsutvärderingen. En regressionsanalys användes för att uppskatta de blandningsförhållanden som krävs för att rikta in sig på 1x LoD och 2x LoD för en delmängd av mtSNV:er.

Positioner där gDNA från båda blodproverna har referensallelgenotyper utvärderades för mtSNV-bestämningar som passerade filter med en icke-referensallel. Den falskt positiva frekvensen beräknades till 0,8 %, i enlighet med ett antagande om noll-LoB enligt "Utvärdering av detektionskapacitet för kliniska laboriemättningsprocedurer", CLSI EP17-A2-ED1:2012". Var och en av de 42 positionerna analyserades oberoende med probit-regression. LoD-värdet definierades som det förväntade VAF-värdet motsvarande detektionsfrekvensen på 95 % (C95). Det totala rapporterade LoD-värdet, definierat som den 95:e percentilen av LoD-värdena från sanningsplatserna, var 4,75 % VAF. Medelvärdet för fördelningen av absoluta skillnader mellan observerad och förväntad VAF för alla observationer beräknades vara 0,83 % med en övre 95 % konfidensgräns på 0,86 % VAF.

Bestämning av tröskelvärde för STR-expansion

På grund av tekniska begränsningar med att täcka STR:er som överskrider sekvensavläsningslängden (ca 135 bp) kommer den observerade STR-längden med TruSight Whole Genome ofta att vara en underskattning av verklig längd. När den verkliga STR-längden överskrider medianfragmentlängden (ca 330 bp), når uppskattningen av STR-längd en plattå. Av denna anledning bedömer TruSight Whole Genome en målriktad uppsättning loci för vilka analysen korrekt kan diskriminera STR:er med observerade längder inom normal variation från de med längder som är större än de som observerats i en förmodat frisk population ("expanderad") (se [Tabell 2](#) för lista över loci bedömd av TruSight Whole Genome).

För att säkerställa en aggregerad negativ procentuell överensstämmelse (NPA) på 95 % över alla STR-platser bedömda av TruSight Whole Genome, fastställdes tröskelvärdena för att bestämma en expanderad STR på den platsen för att uppnå ett genomsnitt på 99,94 % NPA per plats. För att ta hänsyn till den inneboende variabiliteten i uppskattningarna av STR-storlek inom en förmodat frisk population fastställdes tröskelvärden baserat på fördelningen av oberoende observerade STR-längder i den förmodat friska datauppsättningen för 1000 Genomes Project (2 504 prover från olika populationer som bearbetades med DRAGEN 3.7.5 och ExpansionHunter 4.0.2).⁴

För att bekräfta de tröskelvärden som fastställts med hjälp av datauppsättningen 1000 Genomes Project bearbetades extraerat gDNA från 16 cellinje-referensprover (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Program) med en mängd oberoende uppskattade STR-storlekar med TruSight Whole Genome. 10 biblioteksreplikater för vart och ett av de 16 proverna preparerades och testades av sex operatörer under totalt 960 observationer och STR-storlekar uppskattades oberoende för varje replikat. Den observerade falskt positiva provnivån för alla målloci var 0,35 %.

Detektionsgränsen (LoD) uppskattades för de 28 målriktade STR-loci med de testade cellinjerna baserat på de allelstorlekar som observerades med TruSight Whole Genome och de allelstorlekar som förväntades baserat på tidigare oberoende karakterisering ([Tabell 11](#)). För utvalda loci fastställdes en detektionsgräns för mer än en STR på samma plats för totalt 35 STR:er. LoD är den uppskattade storleken vid vilken den förväntade STR-expansionen detekteras för 95 % av alleler baserat på en probit-modell med de bekräftade tröskelvärdena för att särskilja normala och expanderade STR-storlekar. Data för alla platser med kända allelstorlekar poolades tillsammans för att få LoD-uppskattningar för varje plats baserat på den platsspecifika tröskeln för en expanderad STR. FMR1-upprepningenslängden underskattades systematiskt jämfört med andra STR:er och krävde en anpassad modell för att korrekt uppskatta LoD.

Bekräftade platsspecifika tröskelvärden för expanderade STR, uppskattad förväntad och observerad LoD för målplatser och sjukdomströskelvärde baserat på tillgänglig litteratur (endast i illustrativt syfte) för målriktade STR-platser tillhandahålls i [Tabell 11](#). För STR-expansioner som är längre än tröskelvärdet som dikteras av avläsningslängden och för vilka den förväntade längden inte kan observeras direkt uppskattar en observerad längd en genomsnittlig längd som skulle observeras under flera sekvenseringskörningar. För STR-expansioner som är kortare än tröskelvärdet som dikteras av avläsningslängden är de förväntade och observerade längderna desamma.

Tabell 11 Sammanfattning av uppskattad detektionsförmåga för TruSight Whole Genome-målriktade STR-platser

Mål-locus ^a	Utökat STR-tröskelvärde (bp) baserat på datauppsättning från 1000 Genomes Project	Uppskattad LoD (förväntad längd, bp)	Uppskattad LoD (observerad längd, bp)	Sjukdomströskel (verklig längd, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
ATXN1	114	115	115	114 ^{7,8}
ATXN10	200	298	233	3 995 ^{7,8}
ATXN2	102	102	102	105 ^{7,8}
ATXN3	135	189	182	180 ^{7,8}
ATXN7	60	60	60	111 ^{7,8}
ATXN7_GCC	93	101	101	N/A (Ej tillämpligt)
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	N/A (Ej tillämpligt)
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	N/A (Ej tillämpligt)
CNBP_CAGA	68	80	80	N/A (Ej tillämpligt)
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	N/A (Ej tillämpligt)
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}

Mål-locus ^a	Utökat STR-tröskelvärde (bp) baserat på datauppsättning från 1000 Genomes Project	Uppskattad LoD (förväntad längd, bp)	Uppskattad LoD (observerad längd, bp)	Sjukdomströskel (verklig längd, bp) ^b
FXN_A	200	298	233	N/A (Ej tillämpligt)
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	N/A (Ej tillämpligt)
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	33	33	33	N/A (Ej tillämpligt)
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	N/A (Ej tillämpligt)
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	N/A (Ej tillämpligt)
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Loci med alternativa STR:er annoteras av LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (t.ex. ATXN7_GCC).

^b Sjukdomströsklar tillhandahålls endast i illustrativt syfte baserat på publicerad litteratur. N/A (Ej tillämpligt) i denna kolumn indikerar att STR kanske inte är associerat med en publicerad patogen expansion.

^c 100 % av replikaten av NA23378 detekterade en STR-expansion i C9ORF72, vilket tyder på en tidigare icke-karakteriserad expansion vid den platsen i det provet. Detta cellinjeprovet exkluderades från analysen.

^d Intermediära expansioner kan också associeras med en fenotyp.

Denna studie visade liknande precisions- och noggrannhetsprofiler för STR-storleksuppskattningar över olika målriktade loci, där detektionsgräns för STR-expansioner till stor del drivs av det valda tröskelvärdet (baserat på storleksfördelning i 1000 Genomes Project-populationen) snarare än av skillnader i detektionsförmåga mellan platser. Alla uppskattade LoD-värden i den förväntade längdskalan var större än de längder som sågs i förmodade friska populationer och lägre än många publicerade sjukdomströskelvärden, vilket gör de associerade tröskelvärdena för STR-expansionsbestämning användbara för att markera upprepningen vid ett visst locus som potentiellt expanderat. Tröskelvärden som rapporterades här användes för att bedöma noggrannheten för detektion av STR-expansion.

Noggrannhet

Analytisk noggrannhet bestämdes genom att jämföra TruSight Whole Genome-variantbestämningar med resultat erhållna med alternativa metoder. Referensmetoder valdes baserat på betydande skillnad jämfört med TruSight Whole Genome, som använder Nextera™-kullänkad bibliotekspreparering, 2-färgssekvenseringskemi på NovaSeq 6000Dx och DRAGEN 3.9.5 för variantbestämning. Ett representativt tillvägagångssätt för validering av TruSight Whole Genome utfördes med prover som representerade varianter över alla variantklasser som ingick i analysens utdata. Totalt 459 unika prover som passerade analytisk QC användes för

att utvärdera noggrannheten för TruSight Whole Genome. Proverna testades på tre partier med biblioteksprepareringsreagenser och förbrukningsmaterial, fyra partier med S4-sekvenseringssatser, åtta operatörer, fem NovaSeq 6000Dx Instrument och två interna platser. 31 oberoende bibliotekspooler preparerades och sekvenserades.

Följande tabell visar definitioner av mått beräknade i noggrannhetsstudier.

Term	Benämning
Lägre konfidensnivå (LCL)	Ensidig 95 % lägre konfidensgräns med Wilson-metoden.
Negativ procentuell överensstämmelse (NPA) ¹	Procent av negativa platser enligt definitionen i referensmetoden som överensstämmande identifieras som negativa med TruSight Whole Genome.
Positiv procentuell överensstämmelse (PPA) ²	Procentandel varianter som bestäms i referensmetoden som överensstämmande bestäms med TruSight Whole Genome.
Tekniskt positivt prediktivt värde (TPPV) ³	Procentandel varianter som bestäms med TruSight Whole Genome som är överensstämmande bestämda i referensmetoden.

¹ För STR-expansionsdetektionsnoggrannhet och SMN1-alleldetektionsnoggrannhet, NPA = True Negative (sant negativ) / (True Negative + False Positive (sant negativ + falskt positiv)).

² För STR-expansionsdetektionsnoggrannhet och SMN1-alleldetektionsnoggrannhet, PPA = True Positive (sant positiv) / (True Positive + False Negative (sant positiv + falskt negativ)).

³ För STR-expansionsdetektionsnoggrannhet och SMN1-alleldetektionsnoggrannhet, TPPV = True Positive (sant negativ) / (True Positive + False Positive (sant positiv + falskt positiv)).

Noggrannhet för små varianter

Noggrannheten hos bestämningar av små varianter bedömdes med hjälp av genomiskt DNA extraherat från perifert helblod från 195 förmodat friska donatorer. TruSight Whole Genome-variantbestämningar jämfördes med variantbestämningar från ett kliniskt validerat helgenomsekvenseringstest utfört på Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA Laboratory som referensmetod. Referensmetodens arbetsflöde för helgenomsekvensering använder en ligeringsbaserad PCR-fri TruSeq™ bibliotekspreparering, 4-färgssekvenseringskemi på HiSeq™ Sequencing System och DRAGEN 3.8.4 för variantbestämning. Insertioner och deletioner > 31 bp i storlek karakteriserades inte i denna studie eftersom de inte validerades i referensmetoden.

En sammanfattning av noggrannheten för små variantbestämningar visas i [Tabell 12](#) och [Tabell 13](#).

Tabell 12 TruSight Whole Genome Assay Noggrannhet för små varianter stratifierade enligt konfidensnivå och -storlek (förmodat friska blodprover)

Deltyp av variant	Förtroendenivå	Referensmetod överensstämmande bestämmningar	Referensmetod exklusive bestämmningar	Analys överensstämmande bestämmningar	Analys exklusive bestämmningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV:er	Hög	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Mellanliggande	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Låg	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)
Kort deletion (1–5 bp)	Hög	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Mellanliggande	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Låg	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
Medelstor deletion (6–15 bp)	Mellanliggande	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Låg	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
Lång deletion (16–31 bp)	Mellanliggande	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Låg	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)
Kort insertion (1–5 bp)	Hög	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Mellanliggande	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Låg	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)
Medelstor insertion (6–15 bp)	Mellanliggande	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Låg	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)

Deltyp av variant	Förtroendenivå	Referensmetod överensstämmande bestämningar	Referensmetod exklusiva bestämningar	Analys överensstämmande bestämningar	Analys exklusiva bestämningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Lång insertion (16–31 bp)	Mellanliggande	159 927	3 135	159 432	8 639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Låg	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Tabell 13 Sammanfattning av TruSight Whole Genome NPA för bestämningar av små varianter stratifierade enligt förtroendenivå

Förtroendenivå	Överensstämmande negativa bestämningar	Referensmetod Exklusivt negativa bestämningar	NPA (LCL)
Hög	202 276 243 790	127 465 816	99,9 % (99,9 %)
Mellanliggande	3 307 740 675	77 650 177	97,7 % (97,7 %)
Låg	3 653 569 580	439 038 662	89,3 % (89,3 %)

En kompletterande noggrannhetsstudie utfördes för att utvärdera detektion av små varianter med kommersiellt tillgängliga DNA-prover från referenscellinjen (Coriell Institute for Medical Research) med välkaraktiserade bestämningsuppsättningar som genererats av Genome in a Bottle (GIAB) Consortium. För denna studie användes GIAB-bestämningsuppsättningarna som referensmetod. Sanningsuppsättningen i dessa prover inkluderar insertioner och deletioner större än 31 bp, så större insertioner och deletioner inkluderades i denna bedömning. Dessa prover inkluderade HG001-005 och NA24695 med resultaten visade i aggregerad form i [Tabell 14](#).

Tabell 14 TruSight Whole Genome Assay Noggrannhet för små varianter stratifierade enligt konfidensnivå och -storlek (brunnskaraktiserade cellinjeprover)

Deltyp av variant	Förtroendenivå	GIAB överensstämmande bestämningar	GIAB exklusiva bestämningar	Analys överensstämmande bestämningar	Analys exklusiva bestämningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV:er	Hög	21 431 369	2 552	21 439 303	3 954	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Mellanliggande	908 172	1 259	910 058	2 175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Låg	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)

Deltyp av variant	Förtroendenivå	GIAB överensstämmande bestämmningar	GIAB exklusiva bestämmningar	Analys överensstämmande bestämmningar	Analys exklusiva bestämmningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Kort deletion (1–5 bp)	Hög	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Mellanliggande	423 547	788	437 019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Låg	263 828	2 624	281 217	2 088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
Medelstor deletion (6–15 bp)	Mellanliggande	142 671	238	144 997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Låg	86 174	812	91 710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
Lång deletion (≥ 16 bp)	Mellanliggande	34 414	315	34 580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Låg	9 985	393	10 212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Kort insertion (1–5 bp)	Hög	927 288	221	925 787	271	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Mellanliggande	158 346	294	137 081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Låg	93 857	2 402	75 687	1 427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)
Medelstor insertion (6–15 bp)	Mellanliggande	91 117	116	89 054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Låg	37 925	745	36 670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
Lång insertion (≥ 16 bp)	Mellanliggande	11 081	46	11 110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Låg	14 086	607	14 312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

Noggrannhet för kopietalsvariation

Noggrannheten för CNV-bestämning bedömdes med samma referensmetod och förmodat friska donatorer av blodprover (195) som användes för att bedöma noggrannheten för bestämning av små varianter. Varje CNV anses ha detekterats i bestämningsuppsättningen om minst 50 % av den CNV:n täcks av en förening av

CNV-bestämningar av samma typ (VINST/FÖRLUST) i den matchade bestämningsuppsättningen. TruSight Whole Genome definierar en uppsättning genomiska regioner som utesluts från CNV-bestämning baserat på en bedömning av provdata från 1 000 genom och 77 förmodat friska donatorer av blodprov med hjälp av mätvärden relaterade till avvikelser i täckningsdjup, täckningsvarians och luckor i täckning för att fastställa regioner i genomet som inte kan rapporteras för CNV. CNV-bestämning utvärderades endast över genomiska regioner som var gemensamma för både referensmetoden och TruSight Whole Genome. En sammanfattning av noggrannheten för alla CNV-bestämningar visas i [Tabell 15](#) och [Tabell 16](#).

Tabell 15 TruSight Whole Genome Assay Noggrannhet för CNV:er stratifierade efter storlek och typ

Storlek	Typ	Referensmetod överensstämmande bestämningar	Referensmetod exklusive bestämningar	Analys överensstämmande bestämningar	Analys exklusive bestämningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10–25 kbp	VINST	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	FÖRLUST	4 162	457	4 155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)
25–50 kbp	VINST	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	FÖRLUST	1 587	16	1 622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50–100 kbp	VINST	228	0	187	20	>99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	FÖRLUST	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)
≥100 kbp	VINST	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	FÖRLUST	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)

Storlek	Typ	Referensmetod överensstämman de bestämningar	Referensmetod exklusive bestämningar	Analys överensstämman de bestämningar	Analys exklusive bestämningar	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Totalt (alla CNV:er ≥ 10 kb p)	VINST	1 397	216	1 234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	FÖRLUST T	7 013	501	7 043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tabell 16 Sammanfattning av TruSight Whole Genome NPA för CNV-bestämningar

Storlek	Typ	Överensstämmande negativa bestämningar	Negativa bestämningar exklusive för referensmetod	Analys exklusive bestämningar	NPA (LCL)
Totalt (alla CNV:er ≥ 10 kbp)	VINST	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99 % (> 99,99 %)
	FÖRLUST	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99 % (> 99,99 %)

Körningar med homozygositetsnoggrannhet

Tekniskt positivt prediktivt värde (TPPV) för ROH-bestämningar bedömdes med samma referensmetod och förmodat friska blodgivarprover (195) som användes i noggrannhetsbedömningarna för små varianter- och CNV. ROH-händelser fastställdes genom att identifiera regioner i genomet som innehöll en sekvens av homozygota SNV-bestämningar som saknade heterozygota SNV:er eller långa luckor utan varianter. Sådana fröregioner utvidgades sedan till vänster och höger och bedömdes för omgivande homozygota bestämningar eller närvaron av heterozygota SNV:er. ROH-händelser detekterade av TruSight Whole Genome jämfördes med SNV-bestämningar från referensmetoden. En sammanfattning av TPPV för ROH-bestämningar visas i [Tabell 17](#).

Tabell 17 TruSight Whole Genome Noggrannhet för ROH-händelser stratifierade efter storlek

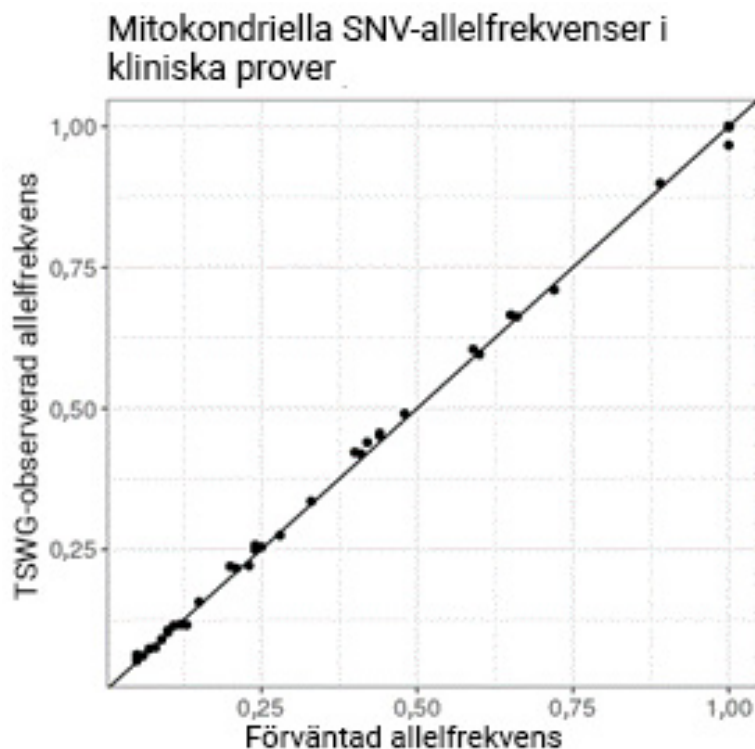
Storlek	TPPV medelvärde	TPPV LCL
10–25 kbp	81,44 %	80,77 %
25–50 kbp	82,14 %	81,82 %
50–100 kbp	81,77 %	81,55 %
100–500 kbp	82,19 %	81,98 %
≥ 10 kbp	82,07 %	81,94 %
≥ 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Positiv procentuell överensstämmelse (PPA) för ROH-detektion fastställdes i kliniska prover från extern källa genom att jämföra TruSight Whole Genome-bestämningar med ROH-bestämningar från ortogonala metoder inklusive kromosomal mikroarray och PCR-baserad bedömning. En ROH-händelse betraktades som detekterad om minst 50 % av regionen som rapporterades som ROH med den ortogonala metoden överlappade föreningen av ROH-händelser som bestämdes av TruSight Whole Genome. PPA mellan TruSight Whole Genome Assay och ortogonala metoder var 34/34 (100 %) för alla förväntade ROH-händelser (≥ 4 Mb).

Noggrannhet för heteroplasmisk mitokondriell SNV

Noggrannheten för mtSNV-bestämning bedömdes i 41 tidigare lagrade kliniska prover från externa kliniker. Varje kliniskt prov innehöll en tidigare rapporterad mtSNV på ett definierat ställe och med en definierad grad av heteroplasm baserat på mtDNA-riktad känd analys med heteroplasm (MITOP). Allelfrekvenser som uppskattades av TruSight Whole Genome var starkt korrelerade med de förväntade frekvenserna som förutspåddes av MITOP. Alla förväntade mtDNA SNV:er detekterades, vilket resulterade i en PPA på 100 % (41/41).

Figur 3 TruSight Whole Genome observerade mitokondriella SNV-allelfrekvenser jämfört med förväntade allelfrekvenser



En ytterligare mtSNV-noggrannhetsstudie utfördes med samma 195 blodprover och referensmetod som beskrivs i noggrannhetsstudierna av liten variant och CNV. Den negativa referensuppsättningen definierades som säkra icke-variantbestämningar (GODKÄNT-filter) och den positiva referensuppsättningen definierades

som mtSNV-bestämningar med en allelfrekvens > 2,5 %. Positioner med antingen ett icke-godkänntfilter eller icke-SNV-variantbestämning exkluderades. En sammanfattning av noggrannheten för mtSNV:er visas i [Tabell 18](#).

Tabell 18 TruSight Whole Genome Noggrannhet för mtDNA SNV-bestämningar

Mätvärde för noggrannhet	Referensmetod för överensstämmende positiv	Referensmetod för exklusivt positivt	Exklusiv positiv analys	Referensmetod för överensstämmende negativ	Referensmetod för exklusivt negativt	Exklusivt negativ analys	Mätvärde för noggrannhet (LCL)
PPA	6 875	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 % (99,96 %)
TPPV	6 875	N/A (Ej tillämpligt)	6	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	99,91 % (99,83 %)
NPA	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	3171049	24268	20564	99,24 % (99,23 %)

Noggrannhet för STR-expansionsdetektering

Noggrannheten för detektion av STR-expansion baserades på totalt 160 prover preparerade genom extraktion av gDNA från kliniskt påverkade individer med expansioner på specifika platser bekräftade med PCR/upprepat-primad (RP)-PCR eller Southern Blot utförd i en CLIA-laboratoriemiljö. Tröskelvärdena som fastställdes i [Tabell 11](#) användes för att definiera STR-status för en allel vid ett specifikt locus som normalt (uppskattad STR-storlek mindre än eller lika med tröskelvärdet) eller expanderat (större än tröskelvärdet).

PPA beräknades med endast kliniskt bekräftade prover, NPA beräknades med endast individuella förmodade friska blodprover och TPPV beräknades över båda provgrupperna. För alleler där ett kliniskt bekräftat prov inte var tillgängligt kunde PPA inte beräknas. Dessutom kunde TPPV inte beräknas för alleler där ett kliniskt bekräftat prov inte var tillgängligt och det inte fanns några falskt positiva bestämningar. NPA beräknades för alla STR-expansioner. Antalet kliniska prover som testats för en viss STR-expansion och noggrannhetsmått anges i [Tabell 19](#).

Tabell 19 TruSight Whole Genome Noggrannhetsmått för STR-expansioner

STR-expansion	Kliniska prover testade	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
AR	8	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATN1	4	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN1	7	66,67 %	> 99,99 %	> 99,99 %

STR-expansion	Kliniska prover testade	PPA	TPPV	NPA
ATXN10	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
ATXN2	5	80,00 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN3	9	> 99,99 %	90,00 %	99,74 %
ATXN7	2	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN7_GCC	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
ATXN8OS	0	N/A (Ej tillämpligt)	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
C9ORF72	21	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
CACNA1A	5	> 99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
CNBP	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
CNBP_CA	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
CNBP_CAGA	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
CSTB	0	N/A (Ej tillämpligt)	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	N/A (Ej tillämpligt)	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FMR1	47	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FXN	0	N/A (Ej tillämpligt)	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
GLS	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
HTT	10	> 99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
JPH3	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
NIPA1	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
NOP56	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
NOTCH2NL	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
PABPN1	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
PHOX2B	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
PPP2R2B	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %

STR-expansion	Kliniska prover testade	PPA	TPPV	NPA
TBP	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
ALLA	160	98,12 %	92,35 %	99,94 %

Bedömningen av övergripande PPA för detektering av STR-expansion över alla loci representerar en god uppskattning av locus-specifik PPA med användning av tillgängliga kliniska prover. Bedömning av PPA specifikt för FMR1-locus kan fungera som en lägre gräns för PPA för loci som inte direkt profilerades på grund av dess stora tröskel för STR-storleksavvikelse.

Noggrannhet för SMN1-alleldetektion

Noggrannheten i detektionen av frånvaron av C-allelen i SMN1 (NM_000344.3:c.840C) bedömdes i 26 kliniska prover från fall med diagnos på spinal muskelatrofi (SMA) och homozygot förlust av exon 7 i SMN1 bekräftad med digital dropp-PCR eller MLPA. Noggrannheten för att identifiera närvaron av SMN1 c.840C-allelen bedömdes i förmodat friska individuella blodprover. Varje prov tilldelades ett enda statistiskt mätvärde (True Positive (sant positivt) (TP), False Positive (falskt positivt) (FP), False Negative (falskt negativt) (FN) eller True Negative (sant negativt) (TN)) baserat på detekterad närvaro (negativ SMA-status) eller frånvaro (positiv SMA-status) av C-allelen vid SMN1-genens c.840-position jämfört med förväntad status. Uppskattningar av PPA, TPPV och NPA gjordes för både den positiva och negativa provuppsättningen (se [Tabell 20](#)).

Tabell 20 Noggrannhetsmått för detektion av frånvaro av SMN1 c.840C-alleler

Mätvärde för noggrannhet	TP	FP	TN	FN	Mätvärde för noggrannhet
PPA	26	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	0	> 99,99 %
TPPV	26	0	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %
NPA	N/A (Ej tillämpligt)	0	195	N/A (Ej tillämpligt)	> 99,99 %

Repeterbarhet

Laborieprecision

Precisionen inom laboriet utvärderades med hjälp av extraherat gDNA med en mängd kända varianter över genomet. Dessa inkluderade mtSNV:er nära och väl över LoD, prover som innehöll SMN1 c.840C-allelen och prover med upprepade FMR och HTT1-expansioner vid längder nära och väl över LoD. Proverna testades med nio unika förhållanden som utformats med tre operatörer, tre partier med biblioteksprepareringsreagens, tre partier med förbrukningsmaterial för sekvensering och tre sekvenseringsinstrument.

Varje prov kördes i dubblett på samma körning för att bedöma variation inom körning och varje testfall testades två gånger för två körningar per tillstånd för variation mellan körningarna. Varje prov bedömdes med hjälp av 36 observationer och designen gav 18 grader av frihet för bedömning av repeterbarhet. Listan över panelmedlemmar, provtyp och bedömda varianter för varje panelmedlem visas i [Tabell 21](#). Prov 1–4 och 9–12 härleddes från både män och kvinnor med självidentifierade kaukasiska, afrikanska och asiatiska anor för att ge en mångsidig provuppsättning.

Tabell 21 Provsammansättning för panel som används för precisionsstudie inom laboratoriet

Panel	Provnr	Provtyp	Varianter
A	1	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	2	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	3	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	4	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	5	Artificiell blandning av gDNA från blod	Mitokondriella SNV:er vid låg LoD-nivå
	6	Artificiell cellinje NA20241 ¹	STR expanderad i FMR1-loci vid låg LoD-nivå
	7	Artificiell cellinje NA20208	STR expanderad i HTT-loci vid låg LoD-nivå
	8	Artificiell cellinje NA23686	Frånvaro av SMN1 c.840C

Panel	Provnr	Provtyp	Varianter
B	9	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	10	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	11	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	12	gDNA från blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ej expanderad, närvaro av SMN1 c.840C
	13	Artificiell blandning av gDNA från blod	mtSNV:er vid hög LoD-nivå
	14	Artificiell cellinje NA07862	STR expanderad i FMR1-loci vid hög LoD-nivå
	15	Artificiell cellinje NA20253	STR expanderad i HTT-loci vid hög LoD-nivå
	16	Artificiell cellinje NA03814	Frånvaro av SMN1 c.840C

Hög LoD-nivå: Variantallelfrekvens ungefär vid $2,0 \times -4,0 \times$ LoD.

Låg LoD-nivå: Variantallelfrekvens ungefär vid $1,0 \times -1,5 \times$ LoD.

¹ Resultat för NA20241 rapporterades inte i slutliga tal eftersom det fastställdes vara signifikant under $1,0 \times$ LoD och uppfyllde därmed inte provkraven.

I den kvalitativa bedömningen rapporteras mått på reproducerbarhet som behandlar varianterna som kvalitativa enheter (variant närvarande eller variant ej närvarande). Olika definitioner av positiva eller negativa bestämningar och olika kvalitativa mätvärden bedömdes och rapporterades för varje varianttyp (Tabell 22). Vid bedömning av reproducerbarheten bestämningar av för små varianter, CNV- och ROH användes variantbestämningarna som gjordes i ett karakteriseringskörningsreplikat för varje prov som fungerade som jämförelsepunkt för alla andra replikat av det provet i studien.

Tabell 22 Sammanfattning av kvalitativ bedömning av reproducerbarhet för varje varianttyp

Varianttyp	Positiv	Negativ	Typ av jämförelse	Kvalitativa mått
Små varianter	Variantbestämning passerar filter	Homozygot referensbestämning passerar filter	Överensstämmelse med bestämningsuppsättning från initiala karakteriseringskörningar	Genomsnittlig positiv överensstämmelse (APA) och genomsnittlig negativ överensstämmelse (ANA)

Varianttyp	Positiv	Negativ	Typ av jämförelse	Kvalitativa mått
CNV:er	CNV-bestämning passerar filter	Genomiska positioner som inte överlappar en passerande kopietalsvariantbestämning	Överensstämmelse med bestämningssuppsättning från initiala karakteriseringskörningar	APA och ANA
ROH	ROH-bestämning	Genomiska positioner överlappar inte en ROH-bestämning	Överensstämmelse med bestämningssuppsättning från initiala karakteriseringskörningar	APA och ANA
STR-expansion	Prov med STR-expansion i minst ett mållocus	Prov utan expansioner i något av de målriktade loci	Överensstämmelse med provstatus definierad genom karakterisering av prov genom ortogonal analys	Procent positiva bestämningar (PPC) och procent negativa bestämningar (PNC)
SMN1 c.840C-detektering	Prov utan C-allel vid c.840-position av SMN1 (SMA-positiv)	Prov som innehåller minst en kopia av C-allelen vid c.840-position för SMN1 (SMA-negativ)	Överensstämmelse med provstatus definierad genom karakterisering av prov genom ortogonal analys	PPC och PNC
mtSNV	Mitokondriell SNV-bestämning passerar filter	Icke-variant position i mitokondriella kromosom passerar filter	Överensstämmelse med variant- och icke-variantbestämningar som gjorts i utspädda prover	PPC och PNC

Den kvantitativa bedömningen av de olika varianttyperna omfattade en utvärdering av variabiliteten av antingen kvantitativa mätvärden som ligger till grund för de kvalitativa bestämningarna eller, när det gäller små varianter, av överensstämmelsemått i förhållande till en referensbestämningssuppsättning. Denna studie utförde både en bedömning av total variabilitet i kvantitativa mätvärden över replikat samt bidragande från olika faktorer som ingår i studien till variabiliteten i sådana kvantitativa mätvärden genom varianskomponentanalys. [Tabell 23](#) sammanfattar de kvantitativa mätvärden som används i analysen av varje varianttyp samt de faktorer som bedömdes för bidrag till variabilitet i det kvantitativa mätvärdet.

Tabell 23 Sammanfattning av kvantitativa mått som används vid bedömning av precision för olika varianttyper

Varianttyp	Kvantitativa mått	Faktorer som bedöms för bidrag till variabilitet
Små varianter	APA och ANA	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, variantundertyp, genomiskt sammanhang
CNV:er	Normaliserat täckningsdjup över CNV-region	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, variantundertyp, variantlängd
ROH	ROH-poäng över ROH-region	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, variantundertyp, variantlängd
STR-expansion	Uppskattning av STR-storlek	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, STR-plats, STR-längd
SMN1 c.840C-detektering	Förhållande mellan logg-sannolikhet för närvaro av referensallelen (C) vid den målriktade positionen	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, SMA-status
Mitokondriell SNV	Variantallelfrekvens	Operatör, parti för biblioteksprepareringssats, instrument, parti för sekvensering av förbrukningsmaterial, variantposition, förväntad variantallelfrekvens

Resultaten för varianskomponentanalysen presenteras i [Tabell 24](#). För små varianter tillskrevs majoriteten av variansen residualfel och inte av de analysrelaterade faktorer som ingick i designen, inklusive sekvenseringssatspartiet, sekvenseringsinstrument, biblioteksprepareringssatsparti, operatör och körning för körning. Det enda undantaget observerades för SNV:er i intermediära konfidensregioner för vilka majoriteten av variansen tillskrevs sekvenseringssatsens parti. I allmänhet tillskrevs en högre varians till analysrelaterade faktorer för små varianter i genomets lågkonfidensregioner. För alla andra varianttyper tillskrevs majoriteten av variansen residualfel och inte analysrelaterade faktorer. Denna studie visar att för de flesta av de små variantundertyperna kan filtrering för regioner med hög och intermediär konfidens i genomet användas för att öka repeterbarheten och minska variabiliteten i analysen. [Extern reproducerbarhet på sidan 65](#) ger en omfattande analys av analysens reproducerbarhet.

Tabell 24 Resultat från varianskomponentanalysstudien

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ingssats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-ringssats	Operatör	
APA	Kort deletion (1–5 bp)	Hög	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %	
		Mellanliggande	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %	
		Låg	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %	
	Medelstor deletion (6–15 bp)	Mellanliggande	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %	
		Låg	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %	
	Lång deletion (16–31 bp)	Mellanliggande	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %	
		Låg	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %	
	Kort insertion (1–5 bp)	Hög	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %	
		Mellanliggande	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %	
		Låg	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %	
	Medelstor insertion (6–15 bp)	Mellanliggande	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %	
		Låg	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %	
	Lång insertion (16–31 bp)	Mellanliggande	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %	
		Låg	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %	
	SNV		Hög	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %	3,17 %
			Mellanliggande	79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
			Låg	56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ings-sats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-rings-sats	Operatör
ANA	SNV	Hög	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Mellanliggande	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Låg	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ingssats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-rings-sats	Operatör
Djup	CNV VINST (10 kbp, 25 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %

Mätvärde	Variantunder- typer	Förtroendenivå	Reste- rande	Parti för sekvenser- ingsatts	Körning- till- körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara- ringsatts	Operatör
	CNV VINST (25 kbp, 50 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %
	CNV VINST (50 kbp, 100 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV VINST (100 kbp, 500 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV FÖRLUST (10 kbp, 25 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV FÖRLUST (25 kbp, 50 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV FÖRLUST (50 kbp, 100 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV FÖRLUST (100 kbp, 500 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ings-sats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-rings-sats	Operatör
Poäng över region	ROH (1 kbp, 10 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	N/A (Ej tillämpligt)	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH \geq 500 kbp	N/A (Ej tillämpligt)	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ingssats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-rings-sats	Operatör
Storleksuppskattning för STR loci ¹	AFF2	N/A (Ej tillämpligt)	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Mätvärde	Variantunder- typer	Förtroendenivå	Reste- rande	Parti för sekvenser- ingsatts	Körning- till- körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara- ringsatts	Operatör
	ATXN7	N/A (Ej tillämpligt)	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_ GCC	N/A (Ej tillämpligt)	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	N/A (Ej tillämpligt)	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	N/A (Ej tillämpligt)	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	N/A (Ej tillämpligt)	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	N/A (Ej tillämpligt)	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	N/A (Ej tillämpligt)	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	N/A (Ej tillämpligt)	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	N/A (Ej tillämpligt)	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	N/A (Ej tillämpligt)	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	N/A (Ej tillämpligt)	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	N/A (Ej tillämpligt)	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Mätvärde	Variantunder-typer	Förtroendenivå	Reste-rande	Parti för sekvenser-ings-sats	Körning-till-körning	Instrument	Parti för biblioteksprepara-rings-sats	Operatör
Sannolikhetsförhållanden för logg (Log Likelihood Ratios)	c.840C i NA03814	N/A (Ej tillämpligt)	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C i NA23686	N/A (Ej tillämpligt)	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV nära LOD	N/A (Ej tillämpligt)	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

¹ Varianskomponentanalys utfördes inte för loci för vilka ingen varians observerades.

Bipacksedel

Extern reproducerbarhet

Extern reproducerbarhet fastställdes med ett enda parti av bibliotekspreparerings- och sekvenseringsreagenser vid tre externa prövningsplatser med två operatörer vid varje plats. Samma prover som användes i studien [Laborieprecision på sidan 52 \(Tabell 21\)](#) användes i reproducerbarhetsstudien med ett undantag: provet NA20241 ersattes med NA20239 för att utvärdera FMR1 loci STR-expansionen vid låg detektionsgräns (LoD). Totalt testades 16 unika prover som två underpaneler med åtta unika prover vardera (panel A och panel B) av varje operatör på varje plats. Tre sekvenseringskörningar utfördes för dubblettbibliotek i varje underpanel för totalt 36 sekvenseringskörningar per unikt prov.

Frekvensen för provgodkännande över 576 provbibliotek med giltiga sekvenseringskörningar, definierad som antalet prover som passerade QC-mått för provbibliotek vid det första försöket, var 99,1 % (571/576; 95 % KI: 98,0 %, 99,6 %). Alla testresultat baseras på de första testerna.

Reproducerbarheten för SNV:er, insertioner, deletioner, CNV:er och ROH bedömdes genom att jämföra data med en referensbestämningssättning baserat på vanlig prestanda över tre karakteriseringskörningar ([Tabell 25](#) och [Tabell 26](#)). Reproducerbarheten för STR-expansioner, frånvaron av SMN1 c.840C-allelen och mtSNV:er bedömdes genom att jämföra data med känd status ([Tabell 27](#)).

Tabell 25 Reproducerbarhet av TruSight Whole Genome för SNV:er, CNV:er och ROH

Varianttyp – stratifiering	Överensstämmande positiva bestämningar ¹ / Positiva bestämningar ²			Genomsnittlig positiv överensstämmelse (%) (95 % KI) ³
	Plats 1	Plats 2	Plats 3	
Små varianter (högt förtroende)				
SNV:er	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9-99,9)
Insertioner – 1–5 bp	34 087 135 /	33 025 772 /	34 089 204 /	99,9
	34 137 298	33 073 087	34 137 792	(99,9-99,9)
Deletioner – 1–5 bp	44 096 186 /	42 733 935 /	44 102 515 /	99,6
	44 255 442	42 883 089	44 256 695	(99,6-99,6)
Små varianter (mellanliggande förtroende)				
SNV:er	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8-98,9)
Insertioner – 1–5 bp	11 075 073 /	10 734 488 /	11 080 468 /	98,9
	11 204 210	10 855 790	11 204 818	(98,9-99,9)
Insertioner – 6–15 bp	4 307 181 /	4 173 626 /	4 308 408 /	99,3
	4 339 975	4 205 261	4 340 277	(99,2-99,3)
Insertioner – ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612 877	632 498	(96,8-96,8)
Deletioner – 1–5 bp	24 571 502 /	23 814 655 /	24 586 095 /	98,9
	24 851 492	24 076 930	24 855 041	(98,9-98,9)
Deletioner – 6–15 bp	8 737 319 /	8 473 410 /	8 746 773 /	98,2
	8 900 796	8 624 403	8 902 016	(98,2-98,2)
Deletioner – ≥ 16 bp	3 590 282 /	3 481 192 /	3 594 420 /	95,0
	3 779 907	3 662 448	3 780 659	(95,0-95,0)
Små varianter (lågt förtroende)				
SNV:er	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2-81,2)
Insertioner – 1–5 bp	17 312 805 /	16 859 987 /	17 406 355 /	89,6
	19 370 351	18 807 745	19 418 516	(89,5-89,6)

Varianttyp – stratifiering	Överensstämmande positiva bestämningar ¹ / Positiva bestämningar ²			Genomsnittlig positiv överensstämmelse (%) (95 % KI) ³
	Plats 1	Plats 2	Plats 3	
Insertioner – 6–15 bp	5 543 985 /	5 404 652 /	5 584 241 /	85,1
	6 529 886	6 338 556	6 550 066	(85,1-85,2)
Insertioner – ≥ 16 bp	3 284 197 /	3 205 165 /	3 314 025 /	77,0
	4 275 286	4 158 315	4 298 399	(77,0-77,0)
Deletioner – 1–5 bp	31 659 416 /	30 751 952 /	31 746 379 /	92,7
	34 194 748	33 158 757	34 226 245	(92,7-92,7)
Deletioner – 6–15 bp	9 189 220 /	8 928 794 /	9 217 516 /	92,1
	9 987 568	9 684 179	9 995 101	(92,1-92,2)
Deletioner – ≥ 16 bp	3 335 400 /	3 241 968 /	3 346 219 /	85,4
	3 909 364	3 791 331	3 912 857	(85,4-85,5)
CNV:er – vinster ≥ 10 kbp	7 883 /	7 664 /	7 916 /	95,5
	8 275	8 012	8 282	(95,2-95,8)
CNV:er – förluster ≥ 10 kbp	11 517 /	11 248 /	11 516 /	95,3
	12 089	11 777	12 113	(95,1-95,5)
ROH – ≥ 500 kbp	6 641 /	6 519 /	6 616 /	98,0
	6 765	6 663	6 756	(97,8-98,2)

¹ Totalt antal överensstämmande positiva bestämningar = Frågeöverensstämmande positiva (QCP) + Referensöverensstämmande positiva (RCP).

² Totalt antal positiva bestämningar = Frågeöverensstämmande positiva (QCP) + Frågeexklusivt positiva (QEP) + Referensöverensstämmande positiva (RCP) + Referensexklusivt positiva (REP).

³ Tvåsidigt 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

Tabell 26 Reproducerbarhet av TruSight Whole Genome för ANA av SNV:er, CNV:er och ROH

Varianttyp – stratifiering	Överensstämmande negativa bestämningar ¹ / Negativa bestämningar ²			Genomsnittlig negativ överensstämmelse (%) (95 % KI) ³
	Plats 1	Plats 2	Plats 3	
Små varianter (högt förtroende)	486 282 620 918 /	470 948 205 740 /	486 285 759 770 /	> 99,9
	486 388 081 375	471 054 131 230	486 389 857 817	(> 99,9-> 99,9)
Små varianter (mellanliggande förtroende)	17 249 915 828 /	16 699 106 194 /	17 253 834 878 /	99,0
	17 427 817 811	16 874 794 553	17 429 035 482	(99,0-99,0)

Varianttyp – stratifiering	Överensstämmande negativa bestämningar ¹ / Negativa bestämningar ²			Genomsnittlig negativ överensstämmelse (%) (95 % KI) ³
	Plats 1	Plats 2	Plats 3	
Små varianter (lågt förtroende)	24 072 615 254 /	23 454 103 344 /	24 180 801 788 /	94,0
	25 608 493 410	24 947 163 687	25 695 956 102	(94,0-94,0)
CNV:er – vinster ≥ 10 kbp	592 486 270 144 /	573 973 293 084 /	592 487 297 632 /	>99,9
	592 500 222 476	573 985 772 396	592 500 614 241	(>99,9->99,9)
CNV:er – förluster ≥ 10 kbp	592 548 802 882 /	574 030 570 254 /	592 547 683 360 /	>99,9
	592 559 825 216	574 041 311 257	592 559 141 007	(>99,9->99,9)
ROH – ≥ 500 kbp	542 968 586 606 /	525 724 060 526 /	543 014 319 116 /	99,2
	547 402 885 905	530 011 754 808	547 444 495 449	(99,2-99,2)

¹ Totalt antal överensstämmande negativa bestämningar = 2 × överensstämmande negativa (CN).

² Totalt antal negativa bestämningar = 2 × överensstämmande negativa (CN) + referensexklusivt negativt (REN) + frågeexklusivt negativt (QEN).

³ Tvåsidigt 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

Tabell 27 Reproducerbarhet TruSight Whole Genome för STR, SMN1 och mtSNV

Varianttyp – stratifiering	Totalt antal förväntade positiva bestämningar	Positiva bestämningar			Totalt antal förväntade negativa bestämningar	Negativa bestämningar			Positiva bestämningar i procent (95 % KI) ¹	Negativa bestämningar i procent (95 % KI) ¹
		Plats 1	Plats 2	Plats 3		Plats 1	Plats 2	Plats 3		
STR-expansioner – hög detektionsnivå (2 x – 4 x LOD)										
STR-expansioner – FMR1	35	12	11	12	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	100 (90,1-100)	N/A (Ej tillämpligt)
STR-expansioner – HTT	36	12	12	12	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	100 (90,4-100)	N/A (Ej tillämpligt)
STR-expansioner – FMR1 och HTT kombinerat	71	24	23	24	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	100 (94,9-100)	N/A (Ej tillämpligt)
STR-expansioner – låg detektionsnivå (1 x – 1,5 x LOD)										
STR-expansioner – FMR1	36	11	10	11	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	88,9 (74,7–95,6)	N/A (Ej tillämpligt)
STR-expansioner – HTT	36	12	12	12	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	100 (90,4-100)	N/A (Ej tillämpligt)

Varianttyp – stratifiering	Totalt antal förväntade positiva bestämningar	Positiva bestämningar			Totalt antal förväntade negativa bestämningar	Negativa bestämningar			Positiva bestämningar i procent (95 % KI) ¹	Negativa bestämningar i procent (95 % KI) ¹
		Plats 1	Plats 2	Plats 3		Plats 1	Plats 2	Plats 3		
STR-expansioner – FMR1 och HTT kombinerat	72	23	22	23	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	94,4 (86,6–97,8)	N/A (Ej tillämpligt)
STR-expansioner – 28 huvudmål STR-loci kombinerat	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	N/A (Ej tillämpligt)	285	96	93	96	N/A (Ej tillämpligt)	100 (98,7–100)
Frånvaro av SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9–100)	100 (98,7–100)
mtSNV:er – hög nivå (2 x – 4 x LOD)	1 080	360	360	360	457 524	152 491	152 489	152 484	100 (99,6–100)	> 99,9 (> 99,9–> 99,9)
mtSNV:er – låg nivå (1 x – 1,5 x LOD)	1 080	360	359	360	457 524	152 481	152 489	152 483	99,9 (99,5–99,9)	> 99,9 (> 99,9–> 99,9)

¹ Tvåsidigt 95 % konfidensintervall beräknat med Wilson Score-metoden.

Felsökning

Använd följande tabell för att felsöka problem i arbetsflödet. Ytterligare felsökning kan krävas om en sekvenseringskörning eller bibliotekspreparering för ett prov misslyckas två gånger. Kontakta Illumina tekniska support.

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Problem med skapande av körning	Den tillhörande Planned Run (planerade körningen) kan inte väljas manuellt i NovaSeq 6000Dx kontrollprogramvara efter laddning av förbrukningsmaterial	Felaktigt biblioteksrörs-ID specificerades under körningsplanering	Se Run Revision (Körningsrevision) i TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Sekvenseringsfel	Status för sekvenseringsfel i Illumina Run Manager	Sekvenseringskörningen avbröts eller kunde inte slutföras på grund av NovaSeq 6000Dx eller problem med hantering av förbrukningsmaterial för sekvensering	<p>Se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105).</p> <p>Efter att ha åtgärdat problemet kan biblioteket poolas igen och återsekvenseras upp till en gång (på grund av volym).</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
		Körningen slutfördes men klustrade inte. Möjligt NovaSeq 6000Dx-problem, problem med hantering av förbrukningsmaterial för sekvensering eller katastrofalt biblioteksprepareringsfel på grund av problem med reagenshantering eller operatörsfel (t.ex. hoppade över ett steg eller kasserade istället för överförde supernatant under storleksval)	<p>Bedöm individuella biblioteksutbyten i FLP med qPCR för $\geq 0,94$ nM (anta 450 bp insertionsstorlek) för att bekräfta/utesluta bibliotekspreparerings- jämfört med sekvenseringsrelaterade problem.</p> <p>Om problem med bibliotekspreparering utesluts och ett sekvenseringsrelaterat problem misstänks, se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105).</p> <p>Om ett problem med biblioteksprepareringen misstänks ska du se Tips och tekniker på sidan 12 och Bruksanvisning på sidan 15 innan du upprepar biblioteksprepareringen och sekvenseringen. Om det förekommer upprepade fel ska du kontakta Illumina teknisk support.</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Sekvenseringsdata kan inte överföras till server	Felstatus i Illumina Run Manager för sekvenseringsfilöverföring för analys	Problem med nätverksanslutning eller strömavbrott på instrument eller server inträffade under dataöverföringen	<p>Kontrollera om det föreligger strömavbrott eller förlorad nätverksanslutning för instrumentet. Vänta tills systemet är inaktivt (sekvensering ska slutföras) och gå sedan till Instrument Settings (Instrumentinställningar), IVD-SETTINGS (IVD-INSTÄLLNINGAR) för att bekräfta anslutning till den angivna utdataplatsen med hjälp av funktionen Browse (Bläddra).</p> <p>Om ytterligare felsökning krävs ska du se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105). Om filöverföringen inte startar om och slutförs efter att anslutnings- eller strömproblem har lösts ska du kontakta Illumina teknisk support.</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Analysen startar inte	Status visar att analys inte startade i Illumina Run Manager även om sekvenseringsfilöverföring för analys slutfördes	Parkoppling eller anslutning mellan instrumentet och DRAGEN Server för NovaSeq 6000Dx förlorad eller DRAGEN-licens har gått ut.	<p>Vänta tills systemet är inaktivt (sekvensering ska slutföras) och gå sedan till DRAGEN för att bekräfta att DRAGEN-licensen är giltig. Om licensen har gått ut ska du kontakta Illumina. Om licensen är giltig ska du välja Run Self-Test (Kör självtest). Om testet misslyckas, eller om alternativet att köra ett självtest inte är tillgängligt, loggar du in på Instrument för att kontrollera om det finns ett fel i samband med serverparkoppling. Se avsnittet Systemkonfiguration i Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105).</p> <p>Analysen ska starta automatiskt efter att problemet har lösts. Avsluta sidan och navigera till fliken Active runs (Aktiva körningar) för att bekräfta att analysen pågår. Om problemet kvarstår ska du kontakta Illumina.</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Analysen fastnar	Status visar Analys pågår i Illumina Run Manager under mycket längre tid än förväntat	Nätverksanslutning eller instrument- eller serverströmtillförsel kan ha störts under analysen och orsakat att analysen fastnat	<p>Avbryt analysen och kontrollera om det föreligger strömavbrott eller förlorad nätverksanslutning till instrumentet.</p> <p>Vänta tills systemet är inaktivt (sekvensering ska slutföras), gå sedan till Instrument Settings (Instrumentinställningar) (IVD-INSTÄLLNINGAR) och bekräfta anslutningen till den angivna utdataplatsen. Om ytterligare felsökning krävs, se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105).</p> <p>Efter att ha åtgärdat problemet ska du Requeue Analysis (Upprepa analys) utan ändringar. Se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Analysfiler kunde inte överföras	Status visar att analysfilöverföring till lagring misslyckades i Illumina Run Manager	Problem med nätverksanslutning eller strömavbrott på instrument eller server inträffade under analysfilöverföring	<p>Avbryt analysen och kontrollera om det föreligger strömavbrott eller förlorad nätverksanslutning till instrumentet.</p> <p>Vänta tills systemet är inaktivt (sekvensering ska slutföras), gå sedan till Instrument Settings (Instrumentinställningar) (IVD-INSTÄLLNINGAR) och bekräfta anslutningen till den angivna utdataplatsen. Om ytterligare felsökning krävs, se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105).</p> <p>Efter att ha åtgärdat problemet ska du Requeue Analysis (Upprepa analys) utan ändringar. Se TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).</p>
Analysen underkänns vid upprepning	Analysen underkänns efter upprepning	Om analysen upprepas kan den ursprungliga körningen ha raderats eller arkiverats och inte längre finnas på den plats som anges för extern lagringsplats	Kontrollera att den ursprungliga körningen fortfarande finns på den externa lagringsplatsen. Om den arkiveras, återställ från arkivet och upprepa sedan analysen igen.

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Underkänd QC av sekvensering	Sammanfattning av QC-resultat för sekvenseringssekvens UNDERKÄND i konsoliderad rapport	”Totalt % >= Q30” under analytisk specifikation på grund av felaktig hantering av förbrukningsmaterial för sekvensering (underlåtenhet att tina fullständigt eller invertera för att blanda efter upptining)	Se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105). Efter att ha åtgärdat problemet kan biblioteket poolas igen och återsekvenseras upp till en gång (på grund av volym).
QC för FASTQ QC underkänt för alla prover	Sammanfattning av QC-resultat för FASTQ och Sammanfattning av QC för provbibliotek QC UNDERKÄNT, med individuella QC-mätresultat FÖRförBIBLIOTEKbibliotek rapporterade som ND, för alla prover i konsoliderad rapport med Sammanfattning av QC för provbibliotek QC GODKÄNT	Indexadaptersatsen som angavs under Create Run (Skapa körning) är inte inpassad med den som användes under biblioteksprepareringen	Visa prover för att granska indexinformationen som används i analysen i IRM. Om en korrigerig behövs ska du se Requeue Analysis (Upprepa analys) i TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokumentnr 200049931).

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
QC av FASTQ underkänt för ett eller flera prover i frånvaro av lågt körningsutbyte; icke-indexerat totalt utbyte (GB) \geq 2 800 GB på S4 eller \geq 1 000 GB på S2	Sammanfattning av QC-resultat för FASTQ och Sammanfattning av QC för provbibliotek QC UNDERKÄNT, med individuella QC-mätresultat för bibliotek rapporterade som ND, för en eller flera men inte alla prover i konsoliderad rapport utan lågt körningsutbyte	Fel vid användning under bibliotekspreparering eller pooling	<p>Bedöm återstående volym(er) i den slutliga biblioteksplattan (FLP) för att bekräfta fel att använda prover från poolade bibliotek. Volymen gör det möjligt för operatören att upprepa pooling och upprepa upp till en gång. Alternativt kan du upprepa underkända prover i nästa biblioteksprepareringsbatch och köra efter att ha granskat Bruksanvisning på sidan 15.</p> <p>Alternativt kan du bedöma individuella biblioteksutbyten i FLP med qPCR för \geq 0,94 nM (anta 450 bp insertionsstorlek) för att bekräfta/utesluta biblioteksprepareringsrelaterade problem. Upprepa underkända prover i nästa biblioteksprepareringsbatch och kör efter att ha granskat Bruksanvisning på sidan 15. Det rekommenderas inte att poola bibliotek över biblioteksprepareringsbatcher på grund av fluktuationer i utbyte mellan batcher, vilket kan resultera i högre % CV och en högre incidens av misslyckad "genomsnittlig autosomal täckning".</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
QC för FASTQ underkänt för vissa prover med lågt körningsutbyte; icke-indexerat totalt utbyte (GB) lågt, < 2 800 GB på S4 eller < 1 000 GB på S2	Sammanfattning av QC-resultat för FASTQ och Sammanfattning av QC för provbibliotek QC UNDERKÄNT, med individuella QC-mätresultat för bibliotek rapporterade som ND, för en eller flera men inte alla prover i konsoliderad rapport med lågt körningsutbyte	Kan indikera ett bibliotekspreparerings- eller sekvenseringsrelaterat problem	<p>Bedöm individuella biblioteksutbyten i FLP med qPCR för $\geq 0,94$ nM (anta 450 bp insertionsstorlek) för att bekräfta/utesluta bibliotekspreparerings- jämfört med sekvenseringsrelaterade problem.</p> <p>Vid misstänkt sekvenseringsproblem, se Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument # 200010105). Efter att ha åtgärdat problemet kan bibliotek poolas igen och återsekvenseras upp till en gång (på grund av begränsad volym).</p> <p>Om ett problem med biblioteksprepareringen misstänks ska du se Tips och tekniker på sidan 12 och Bruksanvisning på sidan 15 innan du upprepar biblioteksprepareringen och sekvenseringen. Om det förekommer upprepade fel ska du kontakta Illumina teknisk support.</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
QC av bibliotek underkänt på grund av låg täckning	Sammanfattning av QC-resultat för bibliotek UNDERKÄNT för ett eller flera prover i den konsoliderade rapporten på grund av genomsnittlig autosomal täckning och/eller procent av autosom med täckning över 20 X och/eller genomsnittlig mitokondriell täckning över genom som inte passerar analytisk specifikation	Problem med provkvalitet eller med bibliotekspreparering(ar)	<p>Utför omkvantifiering med processkontroller för att utesluta problem relaterade till DNA-inmatning.</p> <p>Se Tips och tekniker på sidan 12 och Bruksanvisning på sidan 15 innan du upprepar underkänt/underkända prov(er) i nästa biblioteksprepareringsbatch och körning. Om det förekommer upprepat/upprepade fel för samma prov(er) kan detta indikera provkvalitetsproblem.</p> <p>Om underkännande observeras igen men med olika prover kan detta tyda på ett biblioteksprepareringsrelaterat problem relaterat till operatör, reagens, förbrukningsmaterial eller utrustning. Kontakta Illumina teknisk support om problemet kvarstår.</p>

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Bibliotekets kvalitetskontroll underkänt baserat på GC-bias	QC-resultat för sammanfattning av provbibliotek UNDERKÄNT för ett eller flera prover i konsoliderad rapport på grund av normaliserad täckning vid 60 % till 79 % GC-grupper och/eller normaliserad täckning vid 20 % till 39 % GC-grupper med underkänd analytisk specifikation	Överdriven ELM-överföring eller överhoppad tvätt som orsakar GC-bias i täckningen	Se Tips och tekniker på sidan 12 och Bruksanvisning på sidan 15 innan du upprepar underkänt/underkända prov(er) i nästa biblioteksprepareringsbatch och körning.
QC för bibliotek underkänt baserat på kontaminering för ett eller flera men inte alla prover i körning	QC-resultat för sammanfattning av provbibliotek UNDERKÄNT för ett eller flera men inte alla prover i den konsoliderade rapporten på grund av uppskattad provkontamination med underkänd analytisk specifikation	Kontaminerat prov/kontaminerade prover eller bytte inte spets under prov- eller bibliotekspreparering	Se Tips och tekniker på sidan 12 och Bruksanvisning på sidan 15 innan du upprepar underkänt/underkända prov(er) i nästa biblioteksprepareringsbatch och körning. Om det förekommer upprepat fel/upprepade fel för samma prov(er) kan prov-DNA vara kontaminerat.

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
QC för bibliotek underkänt baserat på kontaminering för alla prover i körning	QC-resultat för sammanfattning av provbibliotek rapporteras som UNDERKÄNT för alla prover i den konsoliderade rapporten på grund av uppskattad provkontamination med underkänd analytisk specifikation	Kontaminerad reagens eller bytte inte spets under provspädning eller bibliotekspreparering	Se Tips och tekniker på sidan 12 för att undvika kontaminering. Upprepa underkända prover i nästa biblioteksprepareringsbatch och kör med färska provspädningar och färsk biblioteksprepareringsatts.
ND Sammanfattning ploiditetsresultat	Sammanfattning av ploiditetsresultat rapporterat som ND (ej fastställt) i konsoliderad rapport	Kön listades som okänt under Create run (Skapa körning)	Bekräfta att "Angiven könskromosomploiditet" i den konsoliderade rapporten var "Okänd". Det rekommenderas att kön listas som "Man" eller "Kvinna" i provdata när det är känt under Create Run (Skapa körning).
		DRAGEN rapporterade ett annat resultat av könsploditet än XX eller XY, t.ex. X0 eller XXY	Granska resultatet för "Ploidy estimation" (uppskattad ploiditet) DRAGEN i den konsoliderade rapporten.

Vävnadstyp	Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Resultat DISCORDANT (ICKE-ÖVERENSSTÄMMANDE) i sammanfattning av ploiditet	Sammanfattning av ploiditetsresultat rapporterat som DISCORDANT (ICKE-ÖVERENSSTÄMMANDE) i konsoliderad rapport.	Potentiellt provbytesproblem	Granska för att bekräfta att provdata som angavs under Create Run (Skapa körning) var korrekta. Om de är fel ska du upprepa analysen med ändringar. Om de är korrekta och ett provbytesproblem misstänks rekommenderas det att upprepa provet/proverna som var DISCORDANT (ICKE-ÖVERENSSTÄMMANDE) i nästa biblioteksprepareringsbatch och köra för att undvika rapportering av felaktiga resultat. Provprogramvaran framtvingar inte underkännande för ett prov med ett sammanfattningsresultat för ploiditet som DISCORDANT (ICKE-ÖVERENSSTÄMMANDE).

Referenser

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

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

Bilaga A

S4 Indexuppsättning 1

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

S4 Indexuppsättning 2

Brunns-ID för indexplatta	Indexnamn	i7-baser	i5-baser
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT

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

S2 Indexuppsättning 1

Brunns-ID för indexplatta	Indexnamn	i7-baser	i5-baser
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAAC TGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

S2 Indexuppsättning 2

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

S2 Indexuppsättning 3

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

S2 Indexuppsättning 4

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

Bilaga B

Ytterligare beräkningar för alternativ 1: 280 ng DNA-inmatning för Quant och Qubit Broad Range kvantifieringsmetoder

Beräkning av koncentrationsgränserna för DNA-stamkoncentrationen på 11,2 till 154,0 ng/μl:

Minsta koncentration baseras på 280,0 ng DNA-inmatning/25,0 μl volym = 11,2 ng/μl.

Baserat på en minsta pipetteringsvolym på 2,0 μl är den maximala koncentrationen $280 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10 % överskott)/2,0 μl = 154,0 ng/μl, i en total volym på 27,5 μl.

Exempelberäkningar med 280,0 ng DNA-inmatning

Arbetat exempel för DNA-stamkoncentration = 95,0 ng/μl:

- DNA-stamvolym (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, rundas av till 3,24 μl för korrekt pipettering med P-10.
- Total volym utspätt DNA är fixerad vid 27,5 μl.
- RSB-volym (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, rundas av till 24,3 μl för korrekt pipettering med P-200.

Arbetat exempel för DNA-stamkoncentration = 308,0 ng/μl:

- DNA-stamvolymen (μl) är fixerad vid 2,0 μl
- Total volym utspätt DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- RSB-volym (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Ytterligare beräkningar för alternativ 2: 350 ng DNA-inmatning för Accuclear Ultra High Sensitivity kvantifieringsmetod

Beräkning av koncentrationsgränserna för DNA-stamkoncentrationer på 14,0 till 192,5 ng/μl:

Minsta koncentration baseras på 350,0 ng DNA-inmatning/25,0 μl volym = 14,0 ng/μl.

Baserat på en minsta pipetteringsvolym på 2,0 μl är den maximala koncentrationen $350 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10 % överskott)/2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Exempelberäkningar med 350,0 ng DNA-inmatning

Arbetat exempel för DNA-stamkoncentration = 118,75 ng/μl:

- DNA-stamvolym (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, rundas av till 3,24 μl för korrekt pipettering med P-10
- Total volym utspätt DNA är fixerad vid 27,5 μl.
- RSB-volym (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, rundas av till 24,3 μl för korrekt pipettering med P-200.

Arbetat exempel för DNA-stamkoncentration = 308,0 ng/μl:

- DNA-stamvolymen (μl) är fixerad vid 2,0 μl
- Total volym utspädd DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- RSB-volym (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Beskrivning av ändring
Dokumentnr 200050132 v00.1	Maj 2024	Korrigerad ingångsvolym för Accuclear kvantifieringsmetod avseende ultrahög känslighet.
Dokumentnr 200050132 v00	April 2024	Första utgåvan.

Bipacksedel

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).

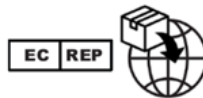
© 2024 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

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.