

NextSeq™ 550Dx-instrument

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK

KUN TIL EKSPORT

Katalognr. 20005715

Tilsigtet brug

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

Procedureprincipper

Illumina NextSeq 550Dx-instrumentet er beregnet til sekventering af DNA-biblioteker vha. *in vitro*-diagnostiske analyser. Inputtet til NextSeq 550Dx består af biblioteker, der er genereret fra DNA, med tilføjelse af prøveindekser og optagelsessekvenser til amplificerede mål. Prøvebibliotekerne fanges på en flowcelle og sekventeres på instrumentet ved brug af SBS-kemi (Sequencing By Synthesis). SBS-kemien anvender en reversibel terminator-metode til at påvise fluorescensmærkede enkelt nukleotidbaser, når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Softwaren Real-Time Analysis (RTA) udfører billedanalyse og basebestemmelse og tildeler en kvalitetsscore til hver base for hver sekventeringscyklus. Når den primære analyse er færdig, kan der udføres sekundær analyse på instrumentet for at behandle basebestemmelserne. NextSeq 550Dx anvender forskellige sekundære analysemoduler afhængigt af arbejdsgangen. Behandling inkluderer demultipleksering, FASTQ-filgenerering, tilpasning, variantbestemmelse og generering af variantbestemmelsesformatfiler (VCF og gVCF) i forbindelse med kibasevariantmodulet eller de somatiske variantmoduler. VCF- og gVCF-filerne indeholder oplysninger om varianter, der findes på specifikke positioner i et referencegenom.

Dual boot-konfiguration

NextSeq 550Dx indeholder en dual boot-konfiguration, der gør det muligt at anvende instrumentet i to forskellige tilstande, enten Dx (diagnostisk brug) eller RUO (kun til forskningsformål). I den diagnostiske tilstand udføres *in vitro*-diagnostiske sekventeringsanalyser, inklusive kibasevariantmodul og somatisk variantmodul. Der må kun anvendes *in vitro*-diagnostiske sekventeringsreagenser i diagnostisk tilstand. NextSeq 550Dx-instrumentets ydelsesegenskaber og procedurebegrænsninger fastsættes ved hjælp af kibasevariantmodulet og det somatiske variantmodul i diagnostisk tilstand.

Procedurens begrænsninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- 2 Kibasevariantmodulet og de somatiske variantmoduler kan levere følgende, når de bruges sammen med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles):
 - ▶ Sekventeringsoutput ≥ 90 gigabaser (Gb)
 - ▶ Læsningslængde (ved kørsel med parret afslutning) 2 x 150 basepar (bp)
 - ▶ Baser lig med eller over Q30 ≥ 75 % ved en læsningslængde på 2 x 150 bp
Mindst 75 % af baserne har kvalitetsscorer ≥ 30 på Phred-skalaen, hvilket viser, at basebestemmelsesnøjagtigheden er over 99,9 %.
- 3 Læsninger med indels (Indsættelser, sletninger eller kombinationer) med indholdslængder > 25 bp bliver ikke tilpasset af analysesoftwarens. Som følge heraf påviser analysesoftwarens ikke indels med en længde > 25 bp.

- 4 Prøvesoftware kan muligvis ikke tilpasse amplikonlæsninger med ekstremt variantindhold, hvilken resulterer i, at området rapporteres som vildtype. Sådant ekstremt indhold omfatter:
 - ▶ Læsninger, der indeholder mere end tre indels
 - ▶ Læsninger med en længde på mindst 30 bp med enkeltnukleotidvariant (SNV)-indhold > 4 % af den totale amplikontargetlængde (eksklusive sondeområder)
 - ▶ Læsninger med en længde < 30 bp med SNV-indhold > 10 % af den totale amplikonlængde (inklusive sondeområder)
- 5 Store varianter, inklusive multinukleotidvarianter (MNV'er) og store indels, kan rapporteres som separate mindre varianter i VCF-outputfilen.
- 6 Sletningsvarianter kan blive frasorteret eller overset, hvis de spænder over to sideliggende amplikoner, og sletningslængden er over eller lig med overlappningen mellem de to amplikoner.
- 7 Systemet kan ikke påvise indels, hvis de støder direkte op til en primer, og der ikke er noget overlappende amplikon. For områder med overlappende amplikoner kan analysen ikke påvise sletninger, hvis området med overlappning er mindre end størrelsen på den pågældende sletning. Eksempel: Hvis området med overlappning mellem to sideliggende amplikoner er to baser, kan analysen ikke påvise nogen sletninger, inklusive begge disse baser. En enkelt basesletning på en af disse baser kan påvises.
- 8 Ligesom det gælder enhver anden hybridiseringsbaseret arbejdsgang til biblioteksklargøring, kan underliggende polymorfismer, mutationer, indsættelser eller sletninger i oligonukleotidbindende områder påvirke de alleler, der undersøges, og dermed de bestemmelser, der frembringes under sekventeringen. For eksempel:
 - ▶ En variant i fase med en variant i primer-området vil eventuelt ikke blive amplificeret, hvilket resulterer i en falsk negativ.
 - ▶ Varianter i primer-området kan forhindre forstærkning af referenceallelen og en deraf følgende ukorrekt bestemmelse af homozygot-variant.
 - ▶ Indel-varianter i primer-området kan forårsage et falsk positivt resultat ved enden af læsningen, der støder op til primeren.
- 9 Indels kan frasorteres på grund af streng-påvirkning, hvis de forekommer nær enden af en læsning, og er blevet blødt afkortet i forbindelse med tilpasning.
- 10 Små MNV'er er ikke blevet valideret, og rapporteres kun i det somatiske variantmodul.
- 11 Sletninger rapporteres i VCF på koordinatet for den foregående base pr. VCF-format. Derfor bør der tages højde for tilstødende varianter, inden det rapporteres, at en individuel basebestemmelse er en homozygot-reference.
- 12 Kimbanespecifikke begrænsninger:
 - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet er designet til at levere kvalitative resultater vedrørende bestemmelse af kimbanevarianter (f.eks. homozygot, heterozygot, vildtype) ved brug af kimbanevariantmodulet til NextSeq 550Dx i Local Run Manager.
 - ▶ Brug af Germline Variant Module kræver en minimal dækning pr. amplikon på 150x for at opnå nøjagtig variantbestemmelse. Som følge heraf kræves 150 understøttende DNA-fragmenter, hvilket svarer til 300 overlappende læsninger med parrede afslutninger. Antallet af prøver og det samlede antal målrettede baser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomindhold kan påvirke dækningen.
 - ▶ Variation af kopiantal kan påvirke, hvorvidt en variant bliver identificeret som homozygot eller heterozygot.
 - ▶ Varianter i bestemt repetitiv kontekst filtreres fra i VCF-filerne. RMxN-gentagelsesfilteret anvendes til at frasortere varianter, hvis hele eller dele af variantsekvensen er til stede gentagne gange i referencegenomet, der støder op til variantpositionen. Hvad angår kimbanevariantbestemmelse skal der være mindst 9 gentagelser i referencen, før en variant kan filtreres. Kun gentagelser med en længde op til 5 bp tages i betragtning (R5x9).
 - ▶ En indel og en SNV på et enkelt locus kan resultere i, at der kun bliver rapporteret en variant.
- 13 Somatisk-specifikke begrænsninger:
 - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet er designet til at levere kvalitative resultater vedrørende somatisk variantbestemmelse (f.eks. forekomst af en somatisk variant med en variantfrekvens, der er større end

eller lig med 0,026 med en detektionsgrænse på 0,05) ved brug af somatisk variantmodul i Local Run Manager til NextSeq 550Dx.

- ▶ Brug af Somatic Variant Module kræver en minimal dækning pr. amplicon på 450x pr. oligonukleotidpulje pr. oligonukleotidpulje for at opnå nøjagtig variantbestemmelse. Som følge heraf kræves 450 understøttende DNA-fragmenter pr. oligonukleotidpulje, hvilket svarer til 900 overlappende læsninger med parret afslutning. Antallet af prøver og det samlede antal målrettede baser påvirker dækningen. CG-indholdet og andet genomindhold kan påvirke dækningen.
- ▶ Hvad angår somatisk variantbestemmelse, skal der være mindst 6 gentagelser i referencen, før varianten filtreres, og kun gentagelser med en længde op til 3 bp tages i betragtning (R3x6).
- ▶ Det somatiske variantmodul kan ikke differentiere mellem kimbanevarianter og somatiske varianter. Modulet er designet til at påvise varianter på tværs af en række variantfrekvenser, men variantfrekvensen kan ikke anvendes til at differentiere somatiske varianter fra kimbanevarianter.
- ▶ Normalvæv i prøven påvirker påvisningen af varianter. Den rapporterede detektionsgrænse er baseret på en variantfrekvens i forhold til det totale DNA, der er ekstraheret fra både tumor- og normalvæv.

Produktkomponenter

- 1 NextSeq 550Dx-instrumentet (katalognr. 20005715)
- 2 Softwaredelene til NextSeq 550Dx-instrumentet, herunder følgende:

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

Driftsbetingelser

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

Udstyr og materialer

Påkrævet udstyr og materialer, sælges separat

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), katalognr. 20019554

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

Påkrævet udstyr og materialer, som ikke medfølger

Brugerleverede materialer til sekventeringskørsler

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

Brugerleverede materialer til vedligeholdelse af instrumentet

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

Retningslinjer for vand til laboratorier

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

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

Advarsler og forsigtighedsregler



FORSIGTIG

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

- 1 **Nogle af reagensdelene, der leveres af Illumina til brug sammen med NextSeq 550Dx-instrumentet, indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger.** Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- 2 Alle blodprøver skal håndteres som værende smitsomme med human immundefekt-virus (hiv), human hepatitis B-virus (HBV) eller andre blodbårne patogener (universelle forsigtighedsregler).
- 3 Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan resultere i fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat prøve kvalitet.
- 4 Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og reagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og reagenser.
- 5 Der skal anvendes korrekt laboratoriepraksis og god laboratoriehygiejne for at forhindre, at PCR-produkterne kontaminerer reagenser, instrumenter og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminering kan forårsage unøjagtige og upålidelige resultater.
- 6 For at forhindre kontaminering skal det sikres, at de områder, der anvendes før og efter amplificeringen, har udstyr og materialer, der er dedikeret til formålet (f.eks. pipetter, pipettespidser, varmeblokke, vortex-blandere og centrifuger).
- 7 Indekset til prøveparring skal matche det trykte pladelayout nøjagtigt. Local Run Manager udfylder automatisk de indeksprimere, der er knyttet til prøvenavnene, når de indtastes i modulet. Brugeren bør kontrollere de indeksprimere, der er knyttet til prøverne, inden sekventeringskørslen startes. Uoverensstemmelser mellem prøven og pladelayoutet resulterer i manglende positiv prøveidentifikation og ukorrekt resultatrapportering.
- 8 Det tilrådes på det kraftigste at installere brugerleveret antivirus-software, for at beskytte computeren mod virus. Se installationsvejledningen i brugermanualen.
- 9 NextSeq 550Dx må ikke betjenes, hvis et eller flere af panelerne er blevet fjernet. Drift af instrumentet uden et eller flere af panelerne medfører potentiel eksponering for netspænding og DC-spænding.
- 10 Rør ikke ved flowcelleholderen i flowcellekammeret. Varmelegemet i dette kammer har en driftstemperatur på 22 °C til 95 °C, og kan forårsage forbrændinger.
- 11 Instrumentet vejer cirka 84 kg (185 lbs) og kan forårsage alvorlig tilskadekomst, hvis det tabes eller håndteres forkert.

Brugervejledning

Følgende instruktioner gælder for kørsel af kimbanevariantmodulet eller det somatiske analysemodul i diagnostisk tilstand på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) eller NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Indtastning af kørselsoplysninger

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

Konfiguration af parametre

- 1 Log ind på Local Run Manager.

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

Import af manifestfiler for kørslen

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



BEMÆRK!

Hvis du ønsker at gøre manifestfiler tilgængelige for alle kørsler via kimbanevariantmodulet eller det somatiske analysemodul, skal du tilføje manifestene ved hjælp af funktionen Module Settings (Modulindstillinger). Denne funktion kræver administratorrettigheder. For yderligere oplysninger henvises til *NextSeq 550Dx Instrumentreferencevejledning (dokumentnr. 100000009513)*.


Angivelse af prøver til kørslen

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


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

Manuel indtastning af prøver

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

- 7 Du kan gennemse, udskrive eller gemme pladelayoutet som reference til klargøring af biblioteker:
 - Vælg ikonet  **Print** (Udskriv) for at vise pladelayoutet. Vælg **Print** (Udskriv) for at udskrive pladelayoutet.
 - Vælg **Export** (Eksportér) for at eksportere prøveoplysninger til en ekstern fil.
- 8 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Import af prøver

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

Klargøring af reagenskassetten

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

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

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



BEMÆRK!

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

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

Klargøring af flowcellen

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

Klargøring af biblioteker til sekventering

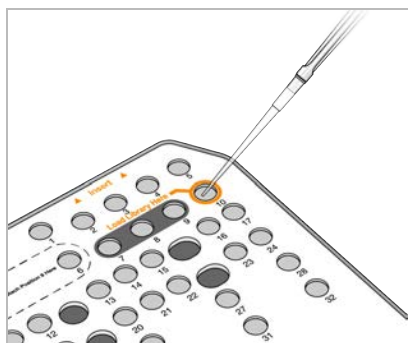
Denaturer og fortynd bibliotekerne til en overførselsvolumen på 1,3 ml. I praksis kan overførselskoncentrationen variere afhængigt af biblioteksklargørings- og kvantificeringsmetoderne. Fortyndingen af prøvebiblioteker afhænger af kompleksiteten af oligonukleotidpuljerne. Du kan finde anvisninger i klargøring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

Overførsel af biblioteker til reagenskassetten

- 1 Rengør folieforseglingen, der dækker for reservoir nr. 10, som er mærket **Load Library Here** (Overfør bibliotek her), med en fnugfri serviet.
- 2 Prik hul på forseglingen med en ren 1 ml-pipettespids.

- Overfør 1,3 ml klargjorte biblioteker til reservoir nr. 10, der er mærket **Load Library Here** (Overfør bibliotek her). Undgå at røre ved folieforseglingen, når du hælder bibliotekerne i.

Figur 1 Overførsel af biblioteker



Konfiguration af en sekventeringskørsel

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

Resultater

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

Demultipleksering

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

Indekslæsninger identificeres ved hjælp af følgende trin:

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

Generering af FASTQ-fil

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

Hver FASTQ-fil indeholder kun læsninger for én prøve, og prøvens navn indgår i navnet på FASTQ-filen.

I kimbanevariantmodulet og de somatiske variantmoduler genereres der otte FASTQ-filer pr. prøve pr. oligopulje, fire fra Læsning 1 og fire fra Læsning 2. Dette output resulterer i samlet set 8 og 16 FASTQ-filer pr. prøve for henholdsvis kimbanevariantmodulet og de somatiske variantmoduler. FASTQ-filerne udgør det primære input til tilpasning.

Tilpasning

Under alignmenttrinnet aligner den bandede Smith-Waterman-algoritme klynger fra hver prøve i forhold til ampliconkonsekvenser, der er specificeret i manifestfilen.

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

Hver læsning med parret afslutning analyseres med hensyn til læsningens tilpasning med de relevante sondesequenser for den pågældende læsning.

- ▶ Læsning 1 analyseres i forhold til den omvendte komplement af den senere DLSO (Downstreams Locus-Specific Oligos).
- ▶ Læsning 2 vurderes i forhold til ULSO (Upstream Locus-Specific Oligos).
- ▶ Hvis starten af en læsning matcher en probesequens med højst tre forskelle (mis-matches eller skift på grund af ledende indels), justeres læsningen i hele sin længde i forhold til ampliconmålet for den pågældende sekvens.
- ▶ På grund af prøvekemien observeres indels inden for DLSO og ULSO ikke.

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

Variantbestemmelse

Variantbestemmelsesprogrammet Pisces er designet til bestemmelse af SNV- og indelvarianter i de klargjorte biblioteker på instrumentet.

Rapporter og yderligere outputfiler

Variantanalysemodulet opretter rapporter i PDF-format og tabulatorseparatoreret (*.txt) format, som viser målinger såsom sekventeringsdybde og varianttællinger. Modulet producerer også outputfiler, såsom VCF- og gVCF-filer (genome Variant Call Format) til variantbestemmelsesprogrammer.

Kvalitetskontrolprocedurer

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

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

Ydelsesegenskaber

Ydelsesegenskaberne for NextSeq 550Dx-instrumentet blev bestemt vha. kimbanevariantmodulet og de somatiske variantmoduler med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og bekræftet vha. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Studierne omfattede prøveindeksering, prøveoverførsel, DNA-input, analysefølsomhed (blindgrænse/detektionsgrænse), nøjagtighed, præcision, metodesammenligning og reproducerbarhed.

Analysestudierne, der blev udført vha. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles), var designet til at evaluere de ydelsesmæssige krav, der tidligere var fastlagt for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Resultaterne viser, at disse reagenskits (v2 og v2.5) har en sammenlignelig ydelse, når TruSeq Custom Amplicon Kit Dx anvendes. Se *indlægssedlen til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* vedrørende ydelsesegenskaber relateret til præanalytiske faktorer, såsom ekstraktionsmetoder eller interfererende stoffer.

Definition af anvendte beregninger vedrørende ydelsesegenskaber

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

Ydelse for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles)

Prøveindeksering

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

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

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

Prøveoverførsel

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

Overførsel i samme kørsel kan ske i forbindelse med generering af klynger, basebestemmelse af indekscyklusser og demultipleksning af prøver. For at teste prøveoverførslen i samme kørsel blev en bibliotekspulje bestående af 46 replikater af hhv. mandlige og kvindelige prøver plus fire NTC'er (no template controls) sekventeret én gang på NextSeq 550Dx-instrumentet. Prøveoverførslen i samme kørsel blev vurderet ved at sammenligne Y-kromosomamplikondækningen i hvert kvindeligt replikat med den gennemsnitlige Y-kromosomamplikondækning i alle mandlige replikater i puljen. Den observerede gennemsnitlige overførsel i samme kørsel var 0,084 %.

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

DNA-input

Blod (Kimbane)

Blod-DNA inputområdet for biblioteksklargøring med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ved hjælp af arbejdsgangen i kimbanevariantmodulet er blevet bestemt for NextSeq 550Dx-instrumentet. Dette blev evalueret ved at udføre et studie med seriel fortynding ved brug af 13 Platinum Genome-prøver og en

repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Biblioteket blev sekventeret på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved brug af ét lot NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles).

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

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

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

Tabel 2 NPA for hvert DNA-input

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

FFPE (Somatisk)

Det formalinfixerede, paraffinindstøbte (FFPE) DNA-inputområde for biblioteksklargøring med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ved brug af arbejdsgangen i det somatiske variantmodul er fastsat for NextSeq 550Dx-instrumentet. DNA-inputområdet blev evalueret ved at udføre et studie med seriel fortynding ved brug af tre Platinum Genome-prøver og en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Platinum Genome-cellelinje GM12878 og GM12877 blev formalinfixeret og indstøbt i paraffin efterfulgt af DNA-ekstraktion. GM12878 blev fortyndet med GM12877, således at allefrekvenserne (VAF'erne) af 81 varianter (55 SNV'er, 10 indsættelser og 16 sletninger) var nær 0,025; 0,05 eller 0,10. Derudover havde hver prøve 91 varianter med højere variantfrekvenser på op til 1,0 VAF. Prøverne blev behandlet i duplikat ved fem DNA-inputniveauer med en gennemsnitlig delta-kvantitativ

cyklus (dCq) på 2,1; 3,6; 4,6; 6,0 og 7,8 i henhold til målinger med TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit. Hvert bibliotek blev sekventeret på to NextSeq 550Dx-instrumenter ved brug af to lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). For at bestemme nøjagtigheden blev prøvernes variantbestemmelser sammenlignet med Platinum Genomes version 2016-1.0. PPA for hver varianttype (SNV'er, indsættelser og sletninger) er angivet i [Tabel 3](#); NPA er angivet i [Tabel 4](#). Det anbefalede DNA-input for varianter på 0,05 VAF eller derover er dCq ≤ 4 med 4,6 som nedre grænse for opfyldelse af ydelsesegenskaberne.

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

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

Tabel 4 NPA for hvert DNA-input

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

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

Dette studie blev gennemført for at evaluere blindgrænsen (LoB) og detektionsgrænsen (LoD) for det somatiske variantmodul på NextSeq 550Dx-instrumentet. Studiet blev gennemført ved brug af en repræsentativ analyse, der var designet til at undersøge diverse gener, der dækkede 12.588 baser på tværs af 23 forskellige kromosomer. Platinum Genome-cellelinje GM12878 og GM12877 blev formalinfikseret og indstøbt i paraffin efterfulgt af DNA-ekstraktion. GM12878 blev fortyndet med GM12877, således at varianthypighederne for 74 varianter (53 SNV'er, 7 indsættelser og 14 sletninger) var $0,05 \pm 0,02$. GM12877 og fortyndet GM12878 (GM12878-D) blev testet over seks på hinanden følgende startdage med et enkelt instrument, hvor der blev

skiftet mellem to lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklusser) og gennemført seks sekventeringskørsler i alt. Denne test resulterede i 60 replikater for hver variant i GM12878-D og 72 replikater for hvert tilsvarende vildtypekoordinat i GM12877 for hvert reagenslot. LoB og LoD blev beregnet ved brug af den klassiske, ikke-parametriske metode i CLSI EP17-A2. LoB og LoD blev beregnet for SNV'er, indsættelser og sletninger separat ved at samle varianthypigheden for en given varianttype. Type I-fejl var defineret som 0,01, og type II-fejl var defineret som 0,05.

Hvad angik LoB, blev de samlede varianthypigheder sorteret fra lavest til højest, og den 99. position for hvert reagenslot for hver varianttype blev beregnet (Tabel 5). Det somatiske variantmodul anvender en skæringsværdi (effektiv LoB) på 0,026 VAF til at bestemme den kvalitative påvisning af varianter. Den beregnede LoB bekræftede, at denne skæringsværdi resulterer i en type I-fejl på højst 0,01.

Tabel 5 Blindgrænse

| Varianttype | Observationer i alt | LoB reagenslot 1 (%) | LoB reagenslot 2 (%) |
|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| SNV | 3816 | 0,77 | 0,77 |
| Indsættelse | 504 | 0,56 | 0,56 |
| Sletning | 1008 | 1,20 | 1,20 |

Hvad angår LoD, blev procentdelen af individuel mutationsfrekvens for hvert reagenslot for hver varianttype under skæringsværdien på 0,026 beregnet Tabel 6. Eftersom procentdelene var lavere end type II-fejlen på 5 % (0,05), blev gennemsnittet af de samlede variantfrekvenser beregnet som LoD (Tabel 6). LoD for hver varianttype blev bestemt på baggrund af den højeste af de to beregnede værdier for de to reagenslots - 4,97 % for SNV'er, 5,12 % for indsættelser og 5,26 % for sletninger.

Tabel 6 Detektionsgrænse

| Reagenslot | Varianttype | Observationer i alt | Antal VAF-målinger < 2,6 % | % af VAF-målinger < 2,6 % | Detektionsgrænse (%) |
|------------|-------------|---------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| 1 | SNV | 3180 | 53 | 1,7 | 4,94 |
| | Indsættelse | 420 | 6 | 1,4 | 5,08 |
| | Sletning | 840 | 7 | 0,8 | 5,22 |
| 2 | SNV | 3180 | 51 | 1,6 | 4,97 |
| | Indsættelse | 420 | 5 | 1,2 | 5,12 |
| | Sletning | 840 | 7 | 0,80 | 5,26 |

Nøjagtighed

Kimbane

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

Tabel 7 Oversigt over kimbaneoverensstemmelse

| Kriterier | Observationer i alt ¹ | Resultat efter observation ² | Resultat efter kørsel ³ |
|----------------------|----------------------------------|---|------------------------------------|
| PPA for SNV | 819 | 98,7 | > 99,9 |
| PPA for indsættelser | 819 | 95,0 | 98,9 |
| PPA for sletninger | 819 | 100 | 100 |

| | | | |
|-----|-----|--------|--------|
| NPA | 819 | 100 | 100 |
| OPA | 819 | > 99,9 | > 99,9 |

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

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle 9 kørsler.

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

Tabel 8 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor variantresultaterne bliver sammenlignet med Platinum Genomes version 2016-1.0 med henblik på PPA-beregninger. De tre varianttyper (SNV'er, indsættelser og sletninger) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkeltnukleotidvarianter og -indsættelser/-sletninger, bliver baseresultater uden varianter sammenlignet med det humane referencegenom hg 19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 8 Kimbaneoverensstemmelse pr. prøve

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

¹ Samlet antal varianter i alle prøvereplikater på tværs af 9 kørsler.

Tabel 9 viser studiedataene pr. prøve, hvor variantresultaterne bliver sammenlignet med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode. Påvisningen er evalueret for hver varianttype - SNV'er, indsættelser og sletninger - separat. Referencepositioner er ikke medtaget.

Tabel 9 Kimbaneoverensstemmelse pr. prøve efter varianttype

| >Prøve | SNV'er | | | Indsættelser | | | Sletninger | | |
|---------|------------|------|-----|--------------|------|-----|------------|------|----|
| | >Forventet | >TP | >FN | >Forventet | >TP | >FN | Forventet | TP | FN |
| NA12877 | 2331 | 2331 | 0 | 1323 | 1323 | 0 | 1134 | 1134 | 0 |
| NA12878 | 5733 | 5733 | 0 | 1260 | 1197 | 1 | 1512 | 1449 | 0 |
| NA12879 | 3591 | 3591 | 0 | 1323 | 1260 | 5 | 1134 | 1134 | 0 |
| NA12880 | 4221 | 4221 | 0 | 1512 | 1512 | 0 | 1260 | 1197 | 0 |
| NA12881 | 4914 | 4913 | 1 | 1512 | 1449 | 2 | 1449 | 1449 | 0 |
| NA12882 | 3717 | 3717 | 0 | 1386 | 1323 | 3 | 1197 | 1134 | 0 |
| NA12883 | 4284 | 4284 | 0 | 1449 | 1449 | 0 | 1386 | 1323 | 0 |
| NA12884 | 4284 | 4284 | 0 | 1575 | 1512 | 6 | 1323 | 1323 | 0 |

| >Prøve | SNV'er | | | Indsættelser | | | Sletninger | | |
|---------|------------|------|-----|--------------|------|-----|------------|------|----|
| | >Forventet | >TP | >FN | >Forventet | >TP | >FN | Forventet | TP | FN |
| NA12885 | 4725 | 4725 | 0 | 1575 | 1512 | 2 | 1386 | 1323 | 0 |
| NA12886 | 4347 | 4347 | 0 | 1449 | 1386 | 7 | 1449 | 1449 | 0 |
| NA12887 | 4284 | 4284 | 0 | 1323 | 1323 | 0 | 1512 | 1512 | 0 |
| NA12888 | 4158 | 4158 | 0 | 1449 | 1449 | 0 | 1197 | 1197 | 0 |
| NA12893 | 4599 | 4599 | 0 | 1386 | 1323 | 1 | 1449 | 1449 | 0 |

Prøverne blev desuden analyseret vedrørende bestemmelse af små indsættelser og sletninger (indels). [Tabel 10](#) indeholder en overordnet oversigt. Der var i alt 71 indels, der varierede i størrelsen fra 1-24 bp for indsættelser og 1-25 for sletninger.

Tabel 10 Oversigt over kimbaneindel-påvisning

| Varianttype | Forventede varianter | TP | FN | Manglende variantbestemmelser | PPA |
|-------------|----------------------|-------|----|-------------------------------|------|
| Indsættelse | 18522 | 18018 | 27 | 477 | 99,9 |
| Sletning | 17388 | 17073 | 0 | 315 | 100 |

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

Tabel 11 Nøjagtighed på kimbane amplicon-niveau

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

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 20 | 3 | 189713161 | 189713248 | 88 | 88 | Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3) | 0,41 | 72072 | 0 | 0 | 100 |
| 21 | 3 | 190106030 | 190106104 | 75 | 74 | Indel | 0,57 | 60543 | 0 | 63 | 99,9 |
| 22 | 4 | 2233667 | 2233744 | 78 | 78 | Poly A (6) | 0,26 | 63882 | 0 | 0 | 100 |
| 23 | 4 | 7780541 | 7780637 | 97 | 97 | Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5) | 0,42 | 79443 | 0 | 0 | 100 |
| 24 | 4 | 15688604 | 15688681 | 78 | 78 | I/T | 0,29 | 63882 | 0 | 0 | 100 |
| 25 | 4 | 56236521 | 56236586 | 66 | 62 | Poly A (5), indel | 0,36 | 50778 | 0 | 0 | 100 |
| 26 | 4 | 102839244 | 102839314 | 71 | 69 | Poly A (5) | 0,46 | 56511 | 0 | 0 | 100 |
| 27 | 4 | 164446743 | 164446804 | 62 | 62 | Poly A (7), indel | 0,27 | 50778 | 0 | 0 | 100 |
| 28 | 5 | 1882081 | 1882158 | 78 | 75 | I/T | 0,78 | 61425 | 0 | 0 | 100 |
| 29 | 5 | 14769061 | 14769144 | 84 | 84 | GT(3), CCA(3) | 0,62 | 68796 | 0 | 0 | 100 |
| 30 | 5 | 41069808 | 41069871 | 64 | 64 | I/T | 0,39 | 52416 | 0 | 0 | 100 |
| 31 | 5 | 74077114 | 74077196 | 83 | 83 | Poly A (6), indel | 0,3 | 67977 | 0 | 0 | 100 |
| 32 | 5 | 147475343 | 147475409 | 67 | 67 | Poly T (5) | 0,37 | 54873 | 0 | 0 | 100 |
| 33 | 5 | 149323731 | 149323821 | 91 | 91 | CT(4), AG(3) | 0,55 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 34 | 5 | 155662213 | 155662287 | 75 | 75 | Indel | 0,43 | 61425 | 0 | 0 | 100 |
| 35 | 6 | 6318713 | 6318814 | 102 | 102 | Poly G (6) | 0,68 | 83538 | 0 | 0 | 100 |
| 36 | 6 | 24949983 | 24950074 | 92 | 92 | Indel | 0,63 | 75348 | 0 | 0 | 100 |
| 37 | 6 | 31084900 | 31084999 | 100 | 94 | GCT(5), indel | 0,61 | 76608 | 0 | 378 | 99,5 |
| 38 | 6 | 32147987 | 32148084 | 98 | 98 | Poly T (5), TCT(3), CTT(3) | 0,55 | 80262 | 0 | 0 | 100 |
| 39 | 6 | 32986864 | 32986958 | 95 | 95 | Indel | 0,53 | 77805 | 0 | 0 | 100 |
| 40 | 6 | 33408498 | 33408583 | 86 | 86 | Poly C (6) | 0,7 | 70434 | 0 | 0 | 100 |
| 41 | 6 | 41647401 | 41647495 | 95 | 94 | Poly G (5), indel | 0,61 | 76986 | 0 | 0 | 100 |
| 42 | 6 | 112435865 | 112435955 | 91 | 91 | Poly A (5) | 0,44 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 43 | 7 | 2021 | | | 73 | I/T | 0,44 | 59787 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 44 | 7 | 66276100 | 66276187 | 88 | 88 | Indel | 0,35 | 72072 | 0 | 0 | 100 |
| 45 | 7 | 77365735 | 77365821 | 87 | 87 | Poly A (7), AG(4) | 0,26 | 71253 | 0 | 0 | 100 |
| 46 | 7 | 110939946 | 110940030 | 85 | 85 | Indel | 0,38 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 47 | 7 | 128533468 | 128533557 | 90 | 90 | Poly G (5), indel | 0,62 | 73710 | 0 | 0 | 100 |
| 48 | 7 | 149503875 | 149503965 | 91 | 91 | Poly G (6), Poly C (6), indel | 0,71 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 49 | 7 | 154404519 | 154404599 | 81 | 66 | I/T | 0,31 | 54054 | 0 | 0 | 100 |
| 50 | 7 | 156476507 | 156476599 | 93 | 93 | Indel | 0,35 | 76167 | 0 | 0 | 100 |
| 51 | 8 | 1817312 | 1817394 | 83 | 83 | I/T | 0,42 | 67977 | 0 | 0 | 100 |
| 52 | 8 | 24811020 | 24811109 | 90 | 89 | Poly G (7), CTC(4), indel | 0,61 | 72171 | 0 | 720 | 99,0 |
| 53 | 8 | 76518625 | 76518691 | 67 | 67 | Indel | 0,3 | 54873 | 0 | 0 | 100 |
| 54 | 9 | 103054909 | 103055006 | 98 | 98 | Poly G (6) | 0,67 | 80262 | 0 | 0 | 100 |
| 55 | 9 | 105586150 | 105586214 | 65 | 65 | Indel | 0,32 | 53235 | 0 | 0 | 100 |
| 56 | 9 | 107620823 | 107620918 | 96 | 96 | I/T | 0,49 | 78624 | 0 | 0 | 100 |
| 57 | 9 | 123769149 | 123769231 | 83 | 83 | AT(3) | 0,37 | 67977 | 0 | 0 | 100 |
| 58 | 9 | 138995345 | 138995441 | 97 | 97 | Poly C (6), indel | 0,68 | 79443 | 0 | 0 | 100 |
| 59 | 10 | 5987120 | 5987198 | 79 | 78 | Poly G (5), indel | 0,47 | 63882 | 0 | 0 | 100 |
| 60 | 10 | 11784629 | 11784726 | 98 | 91 | GC(3) | 0,87 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 61 | 10 | 27317777 | 27317855 | 79 | 79 | Poly T (5) | 0,3 | 64701 | 0 | 0 | 100 |
| 62 | 10 | 33018351 | 33018440 | 90 | 90 | Poly A (5), Poly T (5) | 0,2 | 73710 | 0 | 0 | 100 |
| 63 | 10 | 45084159 | 45084253 | 95 | 95 | Indel | 0,35 | 77805 | 0 | 0 | 100 |
| 64 | 10 | 55892599 | 55892687 | 89 | 88 | AC(11), indel | 0,42 | 71747 | 0 | 325 | 99,5 |
| 65 | 10 | 101611250 | 101611329 | 80 | 80 | I/T | 0,49 | 65520 | 0 | 0 | 100 |
| 66 | 10 | 118351373 | 118351453 | 81 | 81 | I/T | 0,51 | 66339 | 0 | 0 | 100 |
| 67 | 11 | 8159816 | 8159912 | 97 | 96 | I/T | 0,45 | 78624 | 0 | 0 | 100 |
| 68 | 11 | 30177648 | 30177717 | 70 | 70 | Indel | 0,46 | 57330 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|---|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 69 | 11 | 47470345 | 47470444 | 100 | 100 | I/T | 0,65 | 81900 | 0 | 0 | 100 |
| 70 | 11 | 59837679 | 59837740 | 62 | 62 | Indel | 0,37 | 50778 | 0 | 0 | 100 |
| 71 | 11 | 64418856 | 64418957 | 102 | 102 | I/T | 0,59 | 83538 | 0 | 0 | 100 |
| 72 | 11 | 93529612 | 93529684 | 73 | 73 | Poly A (5) | 0,4 | 59787 | 0 | 0 | 100 |
| 73 | 11 | 101347052 | 101347136 | 85 | 85 | I/T | 0,42 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 74 | 11 | 102477336 | 102477426 | 91 | 91 | Poly G (6) | 0,55 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 75 | 11 | 118406285 | 118406369 | 85 | 85 | Indel | 0,53 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 76 | 11 | 120357801 | 120357885 | 85 | 85 | Poly A (5), CA(3), indel | 0,34 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 77 | 11 | 125769313 | 125769397 | 85 | 85 | GA(3) | 0,52 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 78 | 12 | 2834770 | 2834853 | 84 | 84 | Poly C (5), indel | 0,52 | 68796 | 0 | 0 | 100 |
| 79 | 12 | 26811004 | 26811096 | 93 | 93 | Poly A (7), AC(4) | 0,33 | 76167 | 0 | 0 | 100 |
| 80 | 12 | 30881766 | 30881846 | 81 | 81 | I/T | 0,49 | 66339 | 0 | 0 | 100 |
| 81 | 12 | 88474105 | 88474175 | 71 | 71 | Poly A (6) | 0,35 | 58149 | 0 | 0 | 100 |
| 82 | 12 | 120966872 | 120966966 | 95 | 95 | Poly G (5) | 0,68 | 77805 | 0 | 0 | 100 |
| 83 | 13 | 24167504 | 24167576 | 73 | 73 | I/T | 0,52 | 59787 | 0 | 0 | 100 |
| 84 | 13 | 25816961 | 25817049 | 89 | 88 | Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel | 0,22 | 72072 | 0 | 0 | 100 |
| 85 | 13 | 44880112 | 44880200 | 89 | 89 | Indel | 0,49 | 72891 | 0 | 0 | 100 |
| 86 | 13 | 77665218 | 77665294 | 77 | 77 | Indel | 0,39 | 63063 | 0 | 0 | 100 |
| 87 | 14 | 31619327 | 31619393 | 67 | 67 | GA(3),TA(3) | 0,39 | 54873 | 0 | 0 | 100 |
| 88 | 14 | 39517884 | 39517966 | 83 | 83 | I/T | 0,25 | 67977 | 0 | 0 | 100 |
| 89 | 14 | 46958962 | 46959034 | 73 | 72 | Poly T (5), indel | 0,19 | 58642 | 0 | 326 | 99,4 |
| 90 | 14 | 58050030 | 58050110 | 81 | 81 | Indel | 0,38 | 66339 | 0 | 0 | 100 |
| 91 | 14 | 82390559 | 82390649 | 91 | 91 | Indel | 0,35 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 92 | 14 | 92549544 | 92549609 | 66 | 66 | Poly A (5) | 0,41 | 54054 | 0 | 0 | 100 |
| 93 | 14 | 102808496 | 102808589 | 94 | 94 | Indel | 0,62 | 76986 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 94 | 15 | 43170751 | 43170848 | 98 | 96 | Poly C (5) | 0,45 | 78624 | 0 | 0 | 100 |
| 95 | 15 | 63446149 | 63446216 | 68 | 68 | Indel | 0,25 | 55692 | 0 | 0 | 100 |
| 96 | 15 | 77879807 | 77879901 | 95 | 93 | Poly G (5), indel | 0,68 | 76167 | 0 | 0 | 100 |
| 97 | 15 | 81625334 | 81625428 | 95 | 95 | Poly T (6) | 0,43 | 77805 | 0 | 0 | 100 |
| 98 | 15 | 85438263 | 85438334 | 72 | 71 | Indel | 0,65 | 58149 | 0 | 0 | 100 |
| 99 | 15 | 89817413 | 89817503 | 91 | 91 | I/T | 0,36 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 100 | 15 | 89864274 | 89864343 | 70 | 70 | Indel | 0,56 | 57330 | 0 | 0 | 100 |
| 101 | 16 | 1894910 | 1894972 | 63 | 63 | I/T | 0,27 | 51597 | 0 | 0 | 100 |
| 102 | 16 | 28997904 | 28997998 | 95 | 95 | Poly C (5) | 0,67 | 77805 | 0 | 0 | 100 |
| 103 | 16 | 53682908 | 53682994 | 87 | 87 | TA(3) | 0,41 | 71253 | 0 | 0 | 100 |
| 104 | 16 | 57954406 | 57954509 | 104 | 104 | Poly C (5) | 0,67 | 85176 | 0 | 0 | 100 |
| 105 | 16 | 85706375 | 85706465 | 91 | 91 | Poly T (5), indel | 0,37 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 106 | 17 | 3563920 | 3564008 | 89 | 89 | GC(3) | 0,64 | 72891 | 0 | 0 | 100 |
| 107 | 17 | 3594191 | 3594277 | 87 | 87 | Poly C (5), indel | 0,67 | 71247 | 0 | 6 | 100 |
| 108 | 17 | 3970090 | 3970180 | 91 | 91 | Indel | 0,46 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 109 | 17 | 16084945 | 16085037 | 93 | 93 | Indel | 0,26 | 76167 | 0 | 0 | 100 |
| 110 | 17 | 33998759 | 33998849 | 91 | 89 | Poly T (5) | 0,54 | 72891 | 0 | 0 | 100 |
| 111 | 17 | 39589691 | 39589774 | 84 | 82 | Poly A (13), indel (x2) | 0,29 | 66343 | 27 | 788 | 98,8 |
| 112 | 17 | 41244394 | 41244484 | 91 | 91 | Poly A (5) | 0,34 | 74529 | 0 | 0 | 100 |
| 113 | 17 | 45438866 | 45438957 | 92 | 92 | Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel | 0,26 | 75348 | 0 | 0 | 100 |
| 114 | 17 | 61502432 | 61502510 | 79 | 79 | Indel | 0,41 | 64413 | 0 | 288 | 99,6 |
| 115 | 17 | 64023582 | 64023667 | 86 | 86 | Poly T (7) | 0,22 | 70434 | 0 | 0 | 100 |
| 116 | 17 | 72308237 | 72308320 | 84 | 84 | GAG(3) | 0,62 | 68796 | 0 | 0 | 100 |
| 117 | 18 | 2616456 | 2616522 | 67 | 67 | GA(3) | 0,31 | 54873 | 0 | 0 | 100 |
| 118 | 18 | 6980478 | 6980568 | 91 | 91 | I/T | 0,37 | 74529 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 119 | 18 | 9888026 | 9888094 | 69 | 69 | Poly A (6), TG(3) | 0,43 | 56511 | 0 | 0 | 100 |
| 120 | 18 | 38836999 | 38837073 | 75 | 75 | Poly A (5), indel | 0,37 | 61425 | 0 | 0 | 100 |
| 121 | 18 | 47405382 | 47405462 | 81 | 81 | CTC(3), indel | 0,47 | 66339 | 0 | 0 | 100 |
| 122 | 18 | 54815665 | 54815749 | 85 | 85 | CT(3), indel | 0,45 | 69615 | 0 | 0 | 100 |
| 123 | 18 | 59773996 | 59774060 | 65 | 65 | I/T | 0,48 | 53235 | 0 | 0 | 100 |
| 124 | 19 | 625143 | 625241 | 99 | 99 | I/T | 0,59 | 81081 | 0 | 0 | 100 |
| 125 | 19 | 18121418 | 18121491 | 74 | 74 | I/T | 0,68 | 60605 | 1 | 0 | 100 |
| 126 | 19 | 18186574 | 18186643 | 70 | 70 | I/T | 0,64 | 57330 | 0 | 0 | 100 |
| 127 | 20 | 746056 | 746149 | 94 | 94 | I/T | 0,61 | 76986 | 0 | 0 | 100 |
| 128 | 20 | 10633195 | 10633276 | 82 | 82 | AC(3) | 0,59 | 67158 | 0 | 0 | 100 |
| 129 | 20 | 17705633 | 17705708 | 76 | 76 | CT(3) | 0,58 | 62244 | 0 | 0 | 100 |
| 130 | 20 | 21766821 | 21766890 | 70 | 70 | GT(3),TG(4), indel | 0,46 | 57330 | 0 | 0 | 100 |
| 131 | 20 | 25278421 | 25278521 | 101 | 101 | Indel | 0,63 | 82719 | 0 | 0 | 100 |
| 132 | 20 | 50897302 | 50897368 | 67 | 67 | Indel | 0,36 | 54873 | 0 | 0 | 100 |
| 133 | 20 | 62331904 | 62331994 | 91 | 88 | Poly G (6) | 0,73 | 72072 | 0 | 0 | 100 |
| 134 | 20 | 62690860 | 62690946 | 87 | 87 | Indel | 0,57 | 71253 | 0 | 0 | 100 |
| 135 | 21 | 30300823 | 30300888 | 66 | 66 | Indel | 0,35 | 54054 | 0 | 0 | 100 |
| 136 | 21 | 33694176 | 33694273 | 98 | 98 | Poly T (6), CA(3) | 0,54 | 80262 | 0 | 0 | 100 |
| 137 | 21 | 36710706 | 36710792 | 87 | 87 | GT(3), indel | 0,39 | 71253 | 0 | 0 | 100 |
| 138 | 21 | 46644924 | 46644992 | 69 | 69 | Poly A (6), AG(3), indel | 0,32 | 56439 | 0 | 72 | 99,9 |
| 139 | 21 | 46705575 | 46705664 | 90 | 90 | Poly T (5), Poly A (6) | 0,5 | 73710 | 0 | 0 | 100 |
| 140 | 22 | 25750774 | 25750873 | 100 | 100 | Indel | 0,63 | 81900 | 0 | 0 | 100 |
| 141 | 22 | 32439233 | 32439329 | 97 | 97 | I/T | 0,68 | 79443 | 0 | 0 | 100 |
| 142 | 22 | 37409844 | 37409940 | 97 | 97 | Indel | 0,46 | 79443 | 0 | 0 | 100 |
| 143 | 22 | 37637596 | 37637694 | 99 | 99 | I/T | 0,6 | 81081 | 0 | 0 | 100 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 144 | 22 | 47081347 | 47081438 | 92 | 92 | Indel | 0,66 | 75348 | 0 | 0 | 100 |
| 145 | X | 15870424 | 15870492 | 69 | 69 | Poly T (5) | 0,26 | 56511 | 0 | 0 | 100 |
| 146 | X | 135288543 | 135288611 | 69 | 69 | Poly C (5) | 0,62 | 56511 | 0 | 0 | 100 |
| 147 | X | 135290777 | 135290847 | 71 | 71 | I/T | 0,52 | 58149 | 0 | 0 | 100 |
| 148 | Y | 2655397 | 2655461 | 65 | 0 | I/T | 0,55 | 0 | 0 | 0 | I/T |
| 149 | Y | 2655519 | 2655609 | 91 | 0 | I/T | 0,48 | 0 | 0 | 0 | I/T |
| 150 | Y | 2655609 | 2655679 | 71 | 0 | Poly A (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | I/T |

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

Tabel 12 Kimbaneoverensstemmelse mellem prøve NA12878 og NIST-databasen

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

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

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

Somatisk

Nedenfor beskrevne studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af variantbestemmelsen med det somatiske variantmodul på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Cycles).

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

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

Tabel 13 Oversigt over somatiske overensstemmelse

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

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

²Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af alle 9 kørsler.

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

Tabel 14 viser studiedataene med positiv og negativ procentvis overensstemmelse pr. prøve, hvor variantresultaterne bliver sammenlignet med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode med henblik på PPA-beregninger. De tre varianttyper (SNV'er, indsættelser og sletninger) er samlet. Fordi referencemetoden kun giver resultater vedrørende enkeltnukleotidvarianter og -indsættelser/-sletninger, bliver baseresultater uden varianter sammenlignet med det humane referencegenom hg 19 med henblik på NPA-beregninger.

Tabel 14 Somatisk overensstemmelse pr. prøve

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

Tabel 15 viser studiedataene pr. prøve, hvor variantresultaterne bliver sammenlignet med den velkarakteriserede sammensatte referencemetode. Påvisningen er evalueret for hver varianttype - SNV'er, indsættelser og sletninger - separat. Referencepositioner er ikke medtaget.

Tabel 15 Somatisk overensstemmelse pr. prøve efter varianttype

| Prøve | SNV'er | | | Indsættelser | | | Sletninger | | |
|------------|-----------|------|----|--------------|------|----|------------|------|----|
| | Forventet | TP | FN | Forventet | TP | FN | Forventet | TP | FN |
| GM12877 | 999 | 999 | 0 | 567 | 567 | 0 | 486 | 459 | 0 |
| GM12878 | 2457 | 2457 | 0 | 540 | 513 | 0 | 648 | 594 | 0 |
| GM12879 | 1539 | 1539 | 0 | 567 | 540 | 0 | 486 | 459 | 0 |
| GM12884 | 1836 | 1836 | 0 | 675 | 648 | 0 | 567 | 540 | 0 |
| GM12885 | 2025 | 2025 | 0 | 675 | 648 | 0 | 594 | 540 | 0 |
| GM12888 | 1782 | 1782 | 0 | 621 | 621 | 0 | 513 | 486 | 0 |
| GM12877-D5 | 5454 | 5392 | 0 | 1782 | 1647 | 0 | 2052 | 1891 | 0 |
| GM12877-D7 | 5454 | 5406 | 0 | 1782 | 1728 | 0 | 2052 | 1898 | 0 |

| Prøve | SNV'er | | | Indsættelser | | | Sletninger | | |
|------------|-----------|------|----|--------------|------|----|------------|------|----|
| | Forventet | TP | FN | Forventet | TP | FN | Forventet | TP | FN |
| GM12878-D5 | 5454 | 5192 | 28 | 1782 | 1651 | 9 | 2052 | 1856 | 5 |
| GM12878-D7 | 5454 | 5445 | 0 | 1782 | 1719 | 0 | 2052 | 1944 | 0 |

De ti prøver blev desuden analyseret vedrørende bestemmelse af små indsættelser og sletninger (indels) (Tabel 16). Der var i alt 71 indels, der varierede i størrelsen fra 1-24 bp for indsættelser og 1-25 for sletninger.

Tabel 16 Somatisk oversigt over indel-påvisning

| Varianttype | Forventede varianter | TP | FN | Manglende variantbestemmelser | PPA |
|-------------|----------------------|-------|----|-------------------------------|--------|
| Indsættelse | 10773 | 10282 | 9 | 482 | 99,2 |
| Sletning | 11502 | 10667 | 5 | 830 | > 99,9 |

De 150 ampliconer blev designet til at dække et bredt genomindhold. CG-indholdet i ampliconerne varierede fra 0,19-0,87 %. Ampliconerne havde også en række enkeltnukleotid- (f.eks. PolyA, PolyT), dinukleotid- og trinukleotid-gentagelser. Dataene blev kompileret pr. amplicon (Tabel 17) for at klarlægge genomindholdets indvirkning på procentdelen af korrekte bestemmelser. Procentdelen af korrekte bestemmelser består af variant- og referencebestemmelser og er under 100 %, hvis der er ukorrekte eller manglende bestemmelser.

Tabel 17 Nøjagtighed på somatisk amplicon-niveau

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

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|---|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 17 | 3 | 4466229 | 4466321 | 93 | 93 | AT(3), indel | 0,27 | 34534 | 0 | 620 | 98,2 |
| 18 | 3 | 46620561 | 46620643 | 83 | 83 | I/T | 0,43 | 31339 | 0 | 44 | 99,9 |
| 19 | 3 | 49851331 | 49851400 | 70 | 70 | CT(3), indel | 0,49 | 26373 | 0 | 87 | 99,7 |
| 20 | 3 | 189713161 | 189713248 | 88 | 88 | Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG (3) | 0,41 | 32829 | 0 | 857 | 97,5 |
| 21 | 3 | 190106030 | 190106104 | 75 | 74 | Indel | 0,57 | 27925 | 0 | 47 | 99,8 |
| 22 | 4 | 2233667 | 2233744 | 78 | 78 | Poly A (6) | 0,26 | 29327 | 4 | 162 | 99,4 |
| 23 | 4 | 7780541 | 7780637 | 97 | 97 | Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5) | 0,42 | 36585 | 0 | 117 | 99,7 |
| 24 | 4 | 15688604 | 15688681 | 78 | 78 | I/T | 0,29 | 29427 | 0 | 57 | 99,8 |
| 25 | 4 | 56236521 | 56236586 | 66 | 62 | Poly A (5), indel | 0,36 | 23356 | 5 | 75 | 99,7 |
| 26 | 4 | 102839244 | 102839314 | 71 | 69 | Poly A (5) | 0,46 | 25942 | 0 | 140 | 99,5 |
| 27 | 4 | 164446743 | 164446804 | 62 | 62 | Poly A (7), indel | 0,27 | 22944 | 0 | 560 | 97,6 |
| 28 | 5 | 1882081 | 1882158 | 78 | 75 | I/T | 0,78 | 28299 | 0 | 53 | 99,8 |
| 29 | 5 | 14769061 | 14769144 | 84 | 84 | GT(3), CCA (3) | 0,62 | 31658 | 0 | 94 | 99,7 |
| 30 | 5 | 41069808 | 41069871 | 64 | 64 | I/T | 0,39 | 24120 | 0 | 72 | 99,7 |
| 31 | 5 | 74077114 | 74077196 | 83 | 83 | Poly A (6), indel | 0,3 | 31297 | 0 | 77 | 99,8 |
| 32 | 5 | 147475343 | 147475409 | 67 | 67 | Poly T (5) | 0,37 | 25277 | 0 | 55 | 99,8 |
| 33 | 5 | 149323731 | 149323821 | 91 | 91 | CT(4), AG(3) | 0,55 | 34308 | 0 | 90 | 99,7 |
| 34 | 5 | 155662213 | 155662287 | 75 | 75 | Indel | 0,43 | 28266 | 0 | 163 | 99,4 |
| 35 | 6 | 6318713 | 6318814 | 102 | 102 | Poly G (6) | 0,68 | 38489 | 0 | 67 | 99,8 |
| 36 | 6 | 24949983 | 24950074 | 92 | 92 | Indel | 0,63 | 34730 | 0 | 46 | 99,9 |
| 37 | 6 | 31084900 | 31084999 | 100 | 94 | GCT(5), indel | 0,61 | 35057 | 0 | 483 | 98,6 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 38 | 6 | 32147987 | 32148084 | 98 | 98 | Poly T (5), TCT(3), CTT (3) | 0,55 | 36647 | 0 | 406 | 98,9 |
| 39 | 6 | 32986864 | 32986958 | 95 | 95 | Indel | 0,53 | 35681 | 0 | 238 | 99,3 |
| 40 | 6 | 33408498 | 33408583 | 86 | 86 | Poly C (6) | 0,7 | 32438 | 0 | 70 | 99,8 |
| 41 | 6 | 41647401 | 41647495 | 95 | 94 | Poly G (5), indel | 0,61 | 35441 | 0 | 91 | 99,7 |
| 42 | 6 | 112435865 | 112435955 | 91 | 91 | Poly A (5) | 0,44 | 34354 | 0 | 44 | 99,9 |
| 43 | 7 | 2021 | | | 73 | I/T | 0,44 | 27575 | 0 | 28 | 99,9 |
| 44 | 7 | 66276100 | 66276187 | 88 | 88 | Indel | 0,35 | 33060 | 0 | 213 | 99,4 |
| 45 | 7 | 77365735 | 77365821 | 87 | 87 | Poly A (7), AG (4) | 0,26 | 32423 | 0 | 489 | 98,5 |
| 46 | 7 | 110939946 | 110940030 | 85 | 85 | Indel | 0,38 | 32074 | 0 | 56 | 99,8 |
| 47 | 7 | 128533468 | 128533557 | 90 | 90 | Poly G (5), indel | 0,62 | 33791 | 0 | 281 | 99,2 |
| 48 | 7 | 149503875 | 149503965 | 91 | 91 | Poly G (6), Poly C (6), indel | 0,71 | 34316 | 0 | 82 | 99,8 |
| 49 | 7 | 154404519 | 154404599 | 81 | 66 | I/T | 0,31 | 24901 | 0 | 47 | 99,8 |
| 50 | 7 | 156476507 | 156476599 | 93 | 93 | Indel | 0,35 | 35067 | 0 | 87 | 99,8 |
| 51 | 8 | 1817312 | 1817394 | 83 | 83 | I/T | 0,42 | 31365 | 0 | 9 | > 99,9 |
| 52 | 8 | 24811020 | 24811109 | 90 | 89 | Poly G (7), CTC(4), indel | 0,61 | 32781 | 0 | 890 | 97,4 |
| 53 | 8 | 76518625 | 76518691 | 67 | 67 | Indel | 0,3 | 25228 | 0 | 146 | 99,4 |
| 54 | 9 | 103054909 | 103055006 | 98 | 98 | Poly G (6) | 0,67 | 36968 | 0 | 76 | 99,8 |
| 55 | 9 | 105586150 | 105586214 | 65 | 65 | Indel | 0,32 | 24472 | 0 | 100 | 99,6 |
| 56 | 9 | 107620823 | 107620918 | 96 | 96 | I/T | 0,49 | 36203 | 0 | 85 | 99,8 |
| 57 | 9 | 123769149 | 123769231 | 83 | 83 | AT(3) | 0,37 | 31329 | 0 | 45 | 99,9 |
| 58 | 9 | 138995345 | 138995441 | 97 | 97 | Poly C (6), indel | 0,68 | 36472 | 0 | 201 | 99,5 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 59 | 10 | 5987120 | 5987198 | 79 | 78 | Poly G (5), indel | 0,47 | 29473 | 0 | 11 | > 99,9 |
| 60 | 10 | 11784629 | 11784726 | 98 | 91 | GC(3) | 0,87 | 34188 | 0 | 213 | 99,4 |
| 61 | 10 | 27317777 | 27317855 | 79 | 79 | Poly T (5) | 0,3 | 29843 | 0 | 19 | 99,9 |
| 62 | 10 | 33018351 | 33018440 | 90 | 90 | Poly A (5), Poly T (5) | 0,2 | 33968 | 0 | 68 | 99,8 |
| 63 | 10 | 45084159 | 45084253 | 95 | 95 | Indel | 0,35 | 35829 | 0 | 81 | 99,8 |
| 64 | 10 | 55892599 | 55892687 | 89 | 88 | AC(11), indel | 0,42 | 32098 | 88 | 2048 | 93,8 |
| 65 | 10 | 101611250 | 101611329 | 80 | 80 | I/T | 0,49 | 30217 | 0 | 28 | 99,9 |
| 66 | 10 | 118351373 | 118351453 | 81 | 81 | I/T | 0,51 | 30531 | 0 | 96 | 99,7 |
| 67 | 11 | 8159816 | 8159912 | 97 | 96 | I/T | 0,45 | 36105 | 0 | 192 | 99,5 |
| 68 | 11 | 30177648 | 30177717 | 70 | 70 | Indel | 0,46 | 26318 | 0 | 153 | 99,4 |
| 69 | 11 | 47470345 | 47470444 | 100 | 100 | I/T | 0,65 | 37785 | 0 | 24 | 99,9 |
| 70 | 11 | 59837679 | 59837740 | 62 | 62 | Indel | 0,37 | 23368 | 0 | 68 | 99,7 |
| 71 | 11 | 64418856 | 64418957 | 102 | 102 | I/T | 0,59 | 38546 | 0 | 10 | > 99,9 |
| 72 | 11 | 93529612 | 93529684 | 73 | 73 | Poly A (5) | 0,4 | 27516 | 0 | 78 | 99,7 |
| 73 | 11 | 101347052 | 101347136 | 85 | 85 | I/T | 0,42 | 32083 | 0 | 48 | 99,9 |
| 74 | 11 | 102477336 | 102477426 | 91 | 91 | Poly G (6) | 0,55 | 34047 | 0 | 369 | 98,9 |
| 75 | 11 | 118406285 | 118406369 | 85 | 85 | Indel | 0,53 | 32065 | 0 | 74 | 99,8 |
| 76 | 11 | 120357801 | 120357885 | 85 | 85 | Poly A (5), CA (3), indel | 0,34 | 32083 | 0 | 47 | 99,9 |
| 77 | 11 | 125769313 | 125769397 | 85 | 85 | GA(3) | 0,52 | 32103 | 0 | 27 | 99,9 |
| 78 | 12 | 2834770 | 2834853 | 84 | 84 | Poly C (5), indel | 0,52 | 31645 | 16 | 525 | 98,3 |
| 79 | 12 | 26811004 | 26811096 | 93 | 93 | Poly A (7), AC (4) | 0,33 | 34824 | 0 | 330 | 99,1 |
| 80 | 12 | 30881766 | 30881846 | 81 | 81 | I/T | 0,49 | 30497 | 0 | 121 | 99,6 |
| 81 | 12 | 88474105 | 88474175 | 71 | 71 | Poly A (6) | 0,35 | 26773 | 0 | 65 | 99,8 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 82 | 12 | 120966872 | 120966966 | 95 | 95 | Poly G (5) | 0,68 | 35830 | 9 | 72 | 99,8 |
| 83 | 13 | 24167504 | 24167576 | 73 | 73 | I/T | 0,52 | 27498 | 0 | 114 | 99,6 |
| 84 | 13 | 25816961 | 25817049 | 89 | 88 | Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), indel | 0,22 | 32824 | 0 | 566 | 98,3 |
| 85 | 13 | 44880112 | 44880200 | 89 | 89 | Indel | 0,49 | 33574 | 0 | 77 | 99,8 |
| 86 | 13 | 77665218 | 77665294 | 77 | 77 | Indel | 0,39 | 29075 | 0 | 31 | 99,9 |
| 87 | 14 | 31619327 | 31619393 | 67 | 67 | GA(3),TA(3) | 0,39 | 25313 | 0 | 13 | 99,9 |
| 88 | 14 | 39517884 | 39517966 | 83 | 83 | I/T | 0,25 | 31360 | 0 | 22 | 99,9 |
| 89 | 14 | 46958962 | 46959034 | 73 | 72 | Poly T (5), indel | 0,19 | 26499 | 0 | 717 | 97,4 |
| 90 | 14 | 58050030 | 58050110 | 81 | 81 | Indel | 0,38 | 30494 | 0 | 133 | 99,6 |
| 91 | 14 | 82390559 | 82390649 | 91 | 91 | Indel | 0,35 | 34313 | 0 | 86 | 99,7 |
| 92 | 14 | 92549544 | 92549609 | 66 | 66 | Poly A (5) | 0,41 | 24555 | 0 | 1527 | 94,1 |
| 93 | 14 | 102808496 | 102808589 | 94 | 94 | Indel | 0,62 | 35472 | 0 | 69 | 99,8 |
| 94 | 15 | 43170751 | 43170848 | 98 | 96 | Poly C (5) | 0,45 | 36264 | 0 | 24 | 99,9 |
| 95 | 15 | 63446149 | 63446216 | 68 | 68 | Indel | 0,25 | 25667 | 0 | 37 | 99,9 |
| 96 | 15 | 77879807 | 77879901 | 95 | 93 | Poly G (5), indel | 0,68 | 34745 | 0 | 432 | 98,8 |
| 97 | 15 | 81625334 | 81625428 | 95 | 95 | Poly T (6) | 0,43 | 35870 | 0 | 40 | 99,9 |
| 98 | 15 | 85438263 | 85438334 | 72 | 71 | Indel | 0,65 | 26762 | 0 | 76 | 99,7 |
| 99 | 15 | 89817413 | 89817503 | 91 | 91 | I/T | 0,36 | 34286 | 0 | 112 | 99,7 |
| 100 | 15 | 89864274 | 89864343 | 70 | 70 | Indel | 0,56 | 26449 | 0 | 11 | > 99,9 |
| 101 | 16 | 1894910 | 1894972 | 63 | 63 | I/T | 0,27 | 23809 | 0 | 5 | > 99,9 |
| 102 | 16 | 28997904 | 28997998 | 95 | 95 | Poly C (5) | 0,67 | 35860 | 0 | 50 | 99,9 |
| 103 | 16 | 53682908 | 53682994 | 87 | 87 | TA(3) | 0,41 | 32835 | 0 | 60 | 99,8 |
| 104 | 16 | 57954406 | 57954509 | 104 | 104 | Poly C (5) | 0,67 | 39177 | 0 | 144 | 99,6 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|--|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 105 | 16 | 85706375 | 85706465 | 91 | 91 | Poly T (5), indel | 0,37 | 34075 | 0 | 323 | 99,1 |
| 106 | 17 | 3563920 | 3564008 | 89 | 89 | GC(3) | 0,64 | 33632 | 0 | 11 | > 99,9 |
| 107 | 17 | 3594191 | 3594277 | 87 | 87 | Poly C (5), indel | 0,67 | 32752 | 0 | 134 | 99,6 |
| 108 | 17 | 3970090 | 3970180 | 91 | 91 | Indel | 0,46 | 34343 | 0 | 82 | 99,8 |
| 109 | 17 | 16084945 | 16085037 | 93 | 93 | Indel | 0,26 | 35077 | 0 | 78 | 99,8 |
| 110 | 17 | 33998759 | 33998849 | 91 | 89 | Poly T (5) | 0,54 | 33553 | 0 | 89 | 99,7 |
| 111 | 17 | 39589691 | 39589774 | 84 | 82 | Poly A (13), indel (x2) | 0,29 | 30554 | 53 | 2296 | 92,9 |
| 112 | 17 | 41244394 | 41244484 | 91 | 91 | Poly A (5) | 0,34 | 34360 | 0 | 38 | 99,9 |
| 113 | 17 | 45438866 | 45438957 | 92 | 92 | Poly A (7), AT (3), AT(4), AT (4), indel | 0,26 | 34367 | 0 | 418 | 98,8 |
| 114 | 17 | 61502432 | 61502510 | 79 | 79 | Indel | 0,41 | 29751 | 0 | 119 | 99,6 |
| 115 | 17 | 64023582 | 64023667 | 86 | 86 | Poly T (7) | 0,22 | 32176 | 0 | 340 | 99,0 |
| 116 | 17 | 72308237 | 72308320 | 84 | 84 | GAG(3) | 0,62 | 31604 | 7 | 141 | 99,5 |
| 117 | 18 | 2616456 | 2616522 | 67 | 67 | GA(3) | 0,31 | 25273 | 8 | 45 | 99,8 |
| 118 | 18 | 6980478 | 6980568 | 91 | 91 | I/T | 0,37 | 34386 | 0 | 12 | > 99,9 |
| 119 | 18 | 9888026 | 9888094 | 69 | 69 | Poly A (6), TG (3) | 0,43 | 25692 | 0 | 399 | 98,5 |
| 120 | 18 | 38836999 | 38837073 | 75 | 75 | Poly A (5), indel | 0,37 | 27923 | 0 | 893 | 96,9 |
| 121 | 18 | 47405382 | 47405462 | 81 | 81 | CTC(3), indel | 0,47 | 30598 | 0 | 20 | 99,9 |
| 122 | 18 | 54815665 | 54815749 | 85 | 85 | CT(3), indel | 0,45 | 31969 | 0 | 161 | 99,5 |
| 123 | 18 | 59773996 | 59774060 | 65 | 65 | I/T | 0,48 | 24531 | 0 | 48 | 99,8 |
| 124 | 19 | 625143 | 625241 | 99 | 99 | I/T | 0,59 | 37298 | 0 | 124 | 99,7 |
| 125 | 19 | 18121418 | 18121491 | 74 | 74 | I/T | 0,68 | 27881 | 0 | 109 | 99,6 |
| 126 | 19 | 18186574 | 18186643 | 70 | 70 | I/T | 0,64 | 26442 | 0 | 26 | 99,9 |

| Amplikon | Kromosom | Amplikon, Start | Amplikon, Slut | Analyseret fragmentstørrelse | Baser i pålidelige områder | Amplikonets genomindhold | GC-indhold | Korrekte bestemmelser | Ukorrekte bestemmelser | Manglende bestemmelser | % korrekte bestemmelser |
|----------|----------|-----------------|----------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 127 | 20 | 746056 | 746149 | 94 | 94 | I/T | 0,61 | 35501 | 0 | 31 | 99,9 |
| 128 | 20 | 10633195 | 10633276 | 82 | 82 | AC(3) | 0,59 | 30951 | 0 | 72 | 99,8 |
| 129 | 20 | 17705633 | 17705708 | 76 | 76 | CT(3) | 0,58 | 28686 | 0 | 42 | 99,9 |
| 130 | 20 | 21766821 | 21766890 | 70 | 70 | GT(3),TG(4), indel | 0,46 | 26372 | 0 | 88 | 99,7 |
| 131 | 20 | 25278421 | 25278521 | 101 | 101 | Indel | 0,63 | 38159 | 0 | 20 | 99,9 |
| 132 | 20 | 50897302 | 50897368 | 67 | 67 | Indel | 0,36 | 25188 | 0 | 544 | 97,9 |
| 133 | 20 | 62331904 | 62331994 | 91 | 88 | Poly G (6) | 0,73 | 32969 | 0 | 309 | 99,1 |
| 134 | 20 | 62690860 | 62690946 | 87 | 87 | Indel | 0,57 | 32818 | 0 | 77 | 99,8 |
| 135 | 21 | 30300823 | 30300888 | 66 | 66 | Indel | 0,35 | 24758 | 9 | 181 | 99,2 |
| 136 | 21 | 33694176 | 33694273 | 98 | 98 | Poly T (6), CA (3) | 0,54 | 36902 | 0 | 160 | 99,6 |
| 137 | 21 | 36710706 | 36710792 | 87 | 87 | GT(3), indel | 0,39 | 32841 | 0 | 48 | 99,9 |
| 138 | 21 | 46644924 | 46644992 | 69 | 69 | Poly A (6), AG (3), indel | 0,32 | 25939 | 0 | 280 | 98,9 |
| 139 | 21 | 46705575 | 46705664 | 90 | 90 | Poly T (5), Poly A (6) | 0,5 | 33942 | 0 | 78 | 99,8 |
| 140 | 22 | 25750774 | 25750873 | 100 | 100 | Indel | 0,63 | 37733 | 0 | 86 | 99,8 |
| 141 | 22 | 32439233 | 32439329 | 97 | 97 | I/T | 0,68 | 36617 | 0 | 49 | 99,9 |
| 142 | 22 | 37409844 | 37409940 | 97 | 97 | Indel | 0,46 | 36525 | 0 | 162 | 99,6 |
| 143 | 22 | 37637596 | 37637694 | 99 | 99 | I/T | 0,6 | 37398 | 0 | 24 | 99,9 |
| 144 | 22 | 47081347 | 47081438 | 92 | 92 | Indel | 0,66 | 34754 | 0 | 22 | 99,9 |
| 145 | X | 15870424 | 15870492 | 69 | 69 | Poly T (5) | 0,26 | 26046 | 0 | 36 | 99,9 |
| 146 | X | 135288543 | 135288611 | 69 | 69 | Poly C (5) | 0,62 | 26019 | 0 | 63 | 99,8 |
| 147 | X | 135290777 | 135290847 | 71 | 71 | I/T | 0,52 | 26780 | 0 | 58 | 99,8 |
| 148 | Y | 2655397 | 2655461 | 65 | 0 | I/T | 0,55 | 0 | 0 | 0 | I/T |
| 149 | Y | 2655519 | 2655609 | 91 | 0 | I/T | 0,48 | 0 | 0 | 0 | I/T |
| 150 | Y | 2655609 | 2655679 | 71 | 0 | Poly A (5) | 0,37 | 0 | 0 | 0 | I/T |

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

Tabel 18 Somatisk overensstemmelse mellem prøve GM12878 og NIST-databasen

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

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

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

Præcision

Præcisionen af NextSeq 550Dx-instrumentet blev bestemt ved at teste 13 unikke Platinum Genome-prøver ved brug af tre instrumenter, tre reagenslots og tre operatører og generering af ni sekventeringskørsler over fem startdage. Den repræsentative analyse, prøverne og referencemetoden er de samme som dem, der er beskrevet for kimbanenøjagtighedsstudiet. Præcisionsydelse blev bestemt efter varianskomponentanalyse ved brug af VAF som responsvariabel og beregning af standardafvigelse på komponentniveau for instrumentet, reagenslottet og startdagen ([Tabel 19](#)). Det samlede antal observationer, der blev anvendt i analysen for hver instrumentkomponent, operatør eller reagenslotvariabilitet var 699, 176 og 235 for hhv. SNV'er, indsættelser og sletninger.

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

| Komponent | Varianttype | Komponent SD | | Total SD | |
|-----------|-------------|--------------|--------|----------|--------|
| | | Maks. | Median | Maks. | Median |
| Parti | SNV | 0,0076 | 0,0002 | 0,0833 | 0,0154 |
| | Indsættelse | 0,0104 | 0,0000 | 0,0410 | 0,0157 |
| | Sletning | 0,0046 | 0,0005 | 0,0560 | 0,0187 |

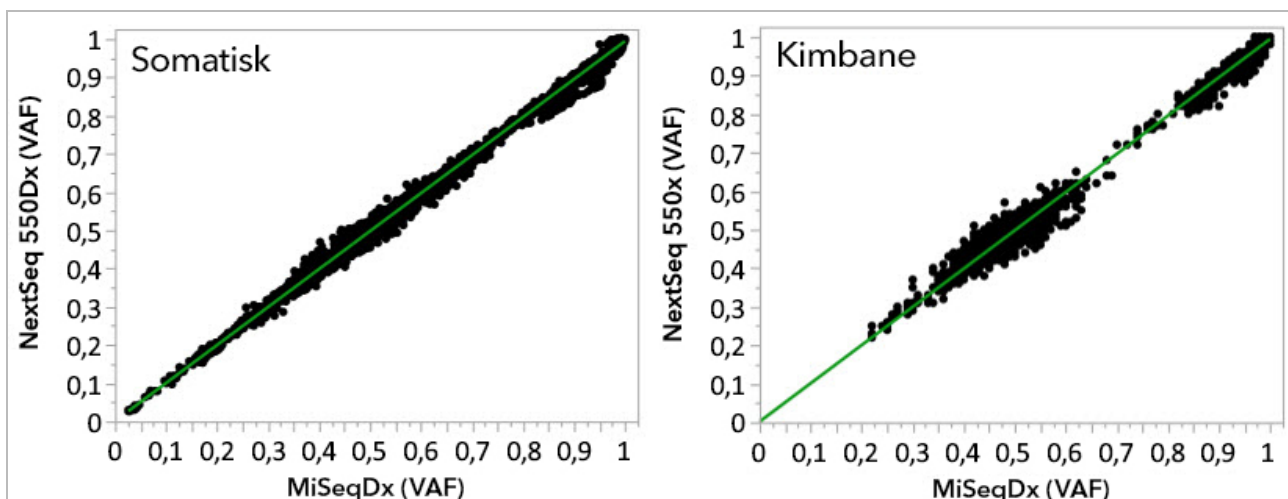
| Komponent | Varianttype | Komponent SD | | Total SD | |
|------------|-------------|--------------|--------|----------|--------|
| | | Maks. | Median | Maks. | Median |
| Instrument | SNV | 0,0114 | 0,0003 | 0,0840 | 0,0153 |
| | Indsættelse | 0,0138 | 0,0009 | 0,0407 | 0,0161 |
| | Sletning | 0,0079 | 0,0008 | 0,0549 | 0,0187 |
| Operatør | SNV | 0,0226 | 0,0008 | 0,0841 | 0,0155 |
| | Indsættelse | 0,0344 | 0,0010 | 0,0417 | 0,0164 |
| | Sletning | 0,0083 | 0,0013 | 0,0547 | 0,0187 |
| Dag | SNV | 0,0277 | 0,0012 | 0,0825 | 0,0160 |
| | Indsættelse | 0,0235 | 0,0012 | 0,0409 | 0,0169 |
| | Sletning | 0,0271 | 0,0014 | 0,0548 | 0,0188 |

Metodesammenligning (sekventeringsplatform)

Helblods- og FFPE-prøver blev analyseret på NextSeq 550Dx-instrumentet og MiSeqDx-instrumentet ved brug af kimbearbejdsgangen og den somatiske arbejdsgang med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

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

Figur 2 VAF-korrelation med MiSeqDx- og NextSeq 550Dx-instrumenterne, hvad angår FFPE- (venstre) og blodprøver (højre) ved brug af analyse 1



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

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

¹To datapunkter blev fjernet på baggrund af den angivne begrænsning af kimbanevariantmodulet.²Bestemmelseskoeficient for VAF-illustrationen som illustreret i Figur 2.

Reproducerbarhed

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

Prøvningen blev udført på tre eksterne centre ved brug af ét lot af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Der blev anvendt et enkelt NextSeq 550Dx-instrument på hvert center. To operatører udførte testen på hvert center. Hver operatør udførte testen tre ikke på hinanden følgende dage på hver enkelt prøvetype på 36 kørsler i alt på de tre centre. Disse tests resulterede i 18 kørsler for henholdsvis kimbanearbejdsgangen og den somatiske arbejdsgang.

Kimbane

Kimbanevarianter med VAF-niveau $\geq 0,2$ rapporteres som positive (variant). Hvad angår forventede positive kimbanevarianter, er dataene blevet evalueret med hensyn til rate for manglende bestemmelse og rate for korrekt positiv bestemmelse inden for hver varianttype (SNV, indsættelse, sletning). **Tabel 21** opsummerer de observerede rater samt nedre og øvre 95 %-konfidensniveauer (LCL/UCL), der er beregnet med Wilson Score-metoden, for hver varianttype.

Tabel 21 Observationer vedrørende kimbaneberapportering for forventede positive resultater efter varianttype

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

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

Tabel 22 Observationer vedrørende kimbaneberapportering for forventede negative resultater

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

Kimbanevarianter med VAF-niveau $\geq 0,2$ og $< 0,7$ rapporteres som positive heterozygoter for varianten, og varianter med VAF-niveau $\geq 0,7$ rapporteres som positive homozygoter for varianten. Der blev anvendt kimbaneprøver med heterozygote varianter for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet ville påvirke genotypebestemmelsen. Cx blev bestemt for begge skæringsværdier (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. Hvad angik den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF, var Cx $\geq 99,999\%$, hvilket viste, at $\geq 99,999\%$ af de heterozygote varianter ville blive rapporteret som heterozygote. Hvad angik den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF, var Cx $\leq 0,001\%$, hvilket viste, at $\leq 0,001\%$ af de heterozygote varianter ville blive rapporteret som homozygote. **Tabel 23** opsummerer resultaterne efter varianttype.

Kimbanevarianter med VAF-niveau $\geq 0,2$ og $< 0,7$ rapporteres som positive heterozygoter for varianten, og varianter med VAF-niveau $\geq 0,7$ rapporteres som positive homozygoter for varianten. Der blev anvendt kimbaneprøver med heterozygote varianter for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet ville påvirke genotypebestemmelsen. Cx for begge skæringsværdier blev bestemt (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. Hvad angik den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF, var Cx

≥ 99,999 %, hvilket viste, at ≥ 99,999 % af de heterozygote varianter ville blive rapporteret som heterozygote. For den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF var $C_x \leq 0,001$ %, hvilket viste, at ≤ 0,001 % af de heterozygote varianter ville blive rapporteret som homozygote. **Tabel 23** opsummerer resultaterne efter varianttype.

Tabel 23 Kimbane-Cx-værdier for heterozygote varianter

| Varianttype | Skæringsværdi på 0,2 VAF | Skæringsværdi på 0,7 VAF |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| | ≥ C99,999 % | ≤ C0,001 % |
| SNV | 94/94 | 94/94 |
| Indsættelser | 24/24 | 24/24 |
| Sletninger | 35/35 | 35/35 |
| I alt | 153 | 153 |

Somatisk

Somatiske varianter med VAF-niveau ≥ 0,026 rapporteres som positive (variant). Observationer med VAF-niveauer ≥ 0,01 og < 0,026 blev betragtet som tvetydige (hverken positive eller negative, markeret som lav variantfrekvens). Resultaterne blev beregnet på tre måder for at vurdere ydeevnen:

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

I de tre tabeller, **Tabel 24**, **Tabel 25** og **Tabel 26** opsummeres bestemmelsesresultaterne for hhv. bedste tilfælde, værste tilfælde og eksklusionstilfælde samt nedre og øvre 95 %-konfidensniveauer (LCL/UCL) beregnet med Wilson Score-metoden.

Tabel 24 Observationer vedrørende somatisk rapportering for forventede positive resultater efter varianttype (bedste tilfælde)

| Varianttype | Korrekt positiv bestemmelse | | | | |
|--------------|-----------------------------|--------|---------|----------|----------|
| | Observeret | I alt | Procent | 95 %-LCL | 95 %-UCL |
| SNV | 54.346 | 54.346 | 100 | 99,99 | 100,00 |
| Indsættelser | 18.036 | 18.036 | 100 | 99,98 | 100,00 |
| Sletninger | 18.381 | 18.381 | 100 | 99,98 | 100,00 |

Tabel 25 Observationer vedrørende somatisk rapportering for forventede positive resultater efter varianttype (værste tilfælde)

| Varianttype | Korrekt positiv bestemmelse | | | | |
|--------------|-----------------------------|--------|---------|----------|----------|
| | Observeret | I alt | Procent | 95 %-LCL | 95 %-UCL |
| SNV | 54.346 | 54.346 | 100 | 99,99 | 100,00 |
| Indsættelser | 18.000 | 18.036 | 99,8 | 99,72 | 99,86 |
| Sletninger | 18.381 | 18.381 | 100 | 99,98 | 100,00 |

Tabel 26 Observationer vedrørende somatisk rapportering for forventede positive resultater efter varianttype (tvetydige rapporteringer fjernet)

| Varianttype | Korrekt positiv bestemmelse | | | | |
|--------------|-----------------------------|--------|---------|----------|----------|
| | Observeret | I alt | Procent | 95 %-LCL | 95 %-UCL |
| SNV | 54.346 | 54.346 | 100 | 99,99 | 100,00 |
| Indsættelser | 18.000 | 18.000 | 100 | 99,98 | 100,00 |
| Sletninger | 18.381 | 18.381 | 100 | 99,98 | 100,00 |

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

Tabel 27 Observationer vedrørende somatisk rapportering for forventede negative resultater

| Varianttype | Manglende bestemmelse | | | | Korrekt bestemmelse | | | | | |
|-------------|-----------------------|-----------|---------|-----------|---------------------|-----------|-----------|---------|----------|----------|
| | Observeret | I alt | Procent | Tvetydige | Ukorrekte | Korrekte | I alt | Procent | 95 %-LCL | 95 %-UCL |
| Vildtype | 36.326 | 8.909.676 | 0,408 | 2254 | 121 | 8.870.975 | 8.873.350 | 99,97 | 99,972 | 99,974 |

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

Tabel 28 Oversigt over somatisk C95

| Varianttype | N | C95 |
|-------------|----|--------|
| SNV | 74 | 0,0613 |
| Indsættelse | 24 | 0,0573 |
| Sletning | 33 | 0,0575 |

Ydelse for NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles)

Oversigt

NextSeq 550Dx understøttes af to reagenskits: NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Der blev gennemført studier med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) for at vise, at NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) kan opfylde de ydelsesmæssige krav, der er til analyser, og som er godkendt og valideret i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles). Der blev udført to biblioteksforberedelser vha. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, én med den kimbanerelaterede arbejdsgang og én med den somatiske arbejdsgang. Biblioteker fra hver enkelt arbejdsgang blev testet med tre lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) vha. tre NextSeq 550Dx-instrumenter. Desuden inkluderede testen i hver enkelt arbejdsgang en enkelt kørsel med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

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

Bekræftelsen med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) viste, at NextSeq 550Dx-instrumentet kunne registrere varianter på 0,05 VAF med en Type II-fejl $\leq 0,05$, og at skæringsværdien på 0,026 VAF, som anvendes af det somatiske variantmodul (effektiv LoB), understøtter en Type I-fejl $\leq 0,01$. På baggrund af disse krav, forventes det, at en variant på 0,05 VAF er større end eller lig med 0,026 VAF i 95 % af tiden, og at en vildtypeposition er mindre end 0,026 VAF i 99 % af tiden. For at sikre, at disse krav blev opfyldt af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) blev der foretaget gentagne målinger på NextSeq 550Dx-instrumentet med vildtypeprøverne (LoB-prøver) og med prøver, der indeholder varianter på 0,05 VAF (LoD-prøver), vha. NextSeq 550 Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Andelen af bestemmelser over og under skæringsværdien på 0,026 blev derefter sammenlignet med kravene i NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles).

Testen inkluderede to LoD-prøver, der hver især havde et unik sæt varianter, der var målrettet 0,05 VAF, og tilsvarende LoB-prøver, der var vildtyper for målrettede varianter. I forbindelse med biblioteksforberedelse blev LoD- og LoB-prøver behandlet i replikater på henholdsvis otte og syv vha. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Biblioteker blev indledningsvist sekventeret vha. NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) for at identificere varianter/genomkoordinater til LoB/LoD-evaluering med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles). Alle varianter med en gennemsnitlig VAF mellem 0,045-0,055 (LoD-varianter) baseret på resultater fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) blev brugt til LoD-analyse (N = 51 varianter). De 51 tilsvarende genomkoordinater blev vurderet i forbindelse med LoB-analysen.

I forbindelse med evaluering af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) blev bibliotekerne sekventeret i tre kørsler over tre sammenhængende dage vha. samme instrument og reagenskitlot. Denne test beløb sig til 24 replikater for hver af de 51 LoD-varianter og 21 replikater for hver af de tilsvarende vildtypepositioner. Andelen af vildtypebestemmelser med VAF < 0,026 er angivet i [Tabel 29](#). Andelen af LoD-variantbestemmelser med VAF, der er større end eller lig med 0,026 er angivet i [Tabel 30](#).

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

| Varianttype | Evaluerede positioner | Observationer i alt | Antal VAF-målinger ≥ 2,6 % | Andel < 2,6 % | Andel 95 % konfidensinterval |
|-------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------------|
| SNV | 32 | 672 | 0 | 1 | 0,994-1 |
| Indsættelse | 11 | 231 | 0 | 1 | 0,984-1 |
| Sletning | 8 | 168 | 0 | 1 | 0,978-1 |

Tabel 30 Andel af bestemmelser ≥ 0,026 VAF for LoD-varianter (evaluering af LoD-krav)

| Varianttype | Evaluerede positioner | Observationer i alt | Antal VAF-målinger < 2,6 % | Antal VAF-målinger ≥ 2,6 % | Andel ≥ 2,6 % | Andel 95 % konfidensinterval |
|-------------|-----------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------------|
| SNV | 32 | 768 | 1 | 767 | 0,999 | 0,993-1 |
| Indsættelse | 11 | 264 | 3 | 261 | 0,989 | 0,967-0,996 |
| Sletning | 8 | 192 | 2 | 190 | 0,99 | 0,963-0,997 |

Nøjagtighed

Kimbane

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

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

Tabel 31 Oversigt over kimbaneoverensstemmelse

| Kriterier | Observationer i alt (v2.5) ¹ | Resultat efter observation (v2.5) ² | Resultat efter observation (v2) ³ | Resultat efter kørsel (V2.5) ⁴ | Resultat efter kørsel (V2) ⁴ |
|----------------------|---|--|--|---|---|
| PPA for SNV | 1056 | 98,7 | 98,7 | > 99,9 | > 99,9 |
| PPA for indsættelser | 1056 | 100 | 100 | 100 | 98,9 |
| PPA for sletninger | 1056 | 95,2 | 95,2 | > 99,9 | 100 |

| Kriterier | Observationer i alt (v2.5) ¹ | Resultat efter observation (v2.5) ² | Resultat efter observation (v2) ³ | Resultat efter kørsel (V2.5) ⁴ | Resultat efter kørsel (V2) ⁴ |
|-----------|---|--|--|---|---|
| NPA | 1056 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| OPA | 1056 | > 99,9 | > 99,9 | > 99,9 | > 99,9 |

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

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

³Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af 1 kørsel (96 observationer i alt).

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

Somatisk

Følgende studie blev udført for at vurdere nøjagtigheden af variantbestemmelsen med det somatiske variantmodul på NextSeq 550Dx-instrumentet ved brug af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Cycles). Ti Platinum Genome FFPE-prøver (to med varianter, der er fortyndet til 0,05 VAF) blev testet vha. en repræsentativ analyse. Der blev foretaget i alt 11 kørsler vha. tre NextSeq 550Dx-instrumenter og tre lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

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

Tabel 32 Oversigt over somatiske overensstemmelse

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

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

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

³Laveste observerede værdi efter prøvereplikat på tværs af 1 kørsel (96 observationer i alt).

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

Præcision

Kimbane

Præcisionen af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) med kimbanevariantmodulet blev evalueret vha. Platinum Genome-prøver og en repræsentativ analyse. Testen bestod af en enkelt biblioteksforberedelse vha. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og inkluderede 12 prøver, der hver især blev behandlet med otte replikater. Bibliotekerne blev sekventeret med tre lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter til ni sekventeringskørsler i alt.

Der blev anvendt prøver med heterozygote varianter for at klarlægge, om analysens inhærente variabilitet ville påvirke genotypebestemmelsen (N = 153 unikke heterozygote varianter). Cx blev bestemt for begge skæringsværdier for kimbanevariantmoduler (0,2 for heterozygote og 0,7 for homozygote genotyper), hvor x er andelen af gentagne tests, der overskrider skæringsværdien. For den nedre skæringsværdi på 0,2 VAF var varianten med Cx-minimumværdier for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) > 99,9 %, hvilket indikerer, at > 99,9 % af de heterozygote varianter

ville blive kaldt heterozygot. For den øvre skæringsværdi på 0,7 VAF var varianten med Cx-maksimumværdier for NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 cycles) < 1,5%, hvilket indikerer, at ≤ 1,5% af de heterozygote varianter ville blive kaldt homozygote. **Tabel 33** opsummerer resultaterne efter varianttype. Cx-værdierne fra den enkelte sekventeringskørsel, der anvendte NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), er angivet til reference.

Tabel 33 Kimbane-Cx-værdier for heterozygote varianter

| Varianttype | N | Skæringsværdi på 0,2 VAF | | Skæringsværdi på 0,7 VAF | |
|--------------|----|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | | Cx-min. (v2.5) ¹ | Cx-min. (v2) ² | Cx-maks. (v2.5) ¹ | Cx-maks. (v2) ² |
| SNV | 94 | > 99,9 % | > 99,9 % | 1,5 % | 1,0 % |
| Indsættelser | 24 | 100 % | 100 % | 0 % | < 0,1 % |
| Sletninger | 35 | 100 % | > 99,9 % | < 0,1 % | < 0,1 % |

¹Cx-værdier, der er baseret på estimerne for Samlet standardafvigelse i varianskomponentanalysen.

²Cx-værdier, der er baseret på Standardafvigelser for prøven.

Somatisk

Præcisionen af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) med det somatiske variantmodul blev evalueret vha. Platinum Genome FFPE-prøver og en repræsentativ analyse. Testen bestod af en enkelt biblioteksforberedelse vha. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx og inkluderede to prøver med hver især otte replikater. Bibliotekerne blev sekventeret vha. tre lots af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) og tre NextSeq 550Dx-instrumenter til ni sekventeringskørsler i alt.

De somatiske varianter med forventede VAF-niveauer ≤ 0,10 VAF (N = 131 unikke varianter) blev brugt til at evaluere instrumentvariabiliteten i nærheden af VAF-skæringsværdien for det somatiske variantmodul (somatiske varianter med et VAF-niveau ≥ 0,026 kaldes positive for varianten). C95-værdier blev bestemt for hver enkelt somatisk variant. C95-værdierne repræsenterer den VAF-værdi, hvor sandsynligheden for, at den er højere end VAF-skæringsværdien for det somatiske variantmodul, er 95 %. De højeste C95-værdier efter varianttype er angivet i **Tabel 34**. C95-resultaterne fra en enkelt sekventeringskørsel, der anvendte NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles), er angivet til reference.

Tabel 34 Oversigt over somatisk C95

| Varianttype | Antal evaluerede varianter | C95 (v2.5) ¹ | C95 (v2) ² |
|--------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| SNV | 74 | 0,064 | 0,063 |
| Indsættelser | 24 | 0,062 | 0,061 |
| Sletninger | 33 | 0,060 | 0,060 |

¹C95-værdier, der er baseret på estimerne for Samlet standardafvigelse i varianskomponentanalysen.

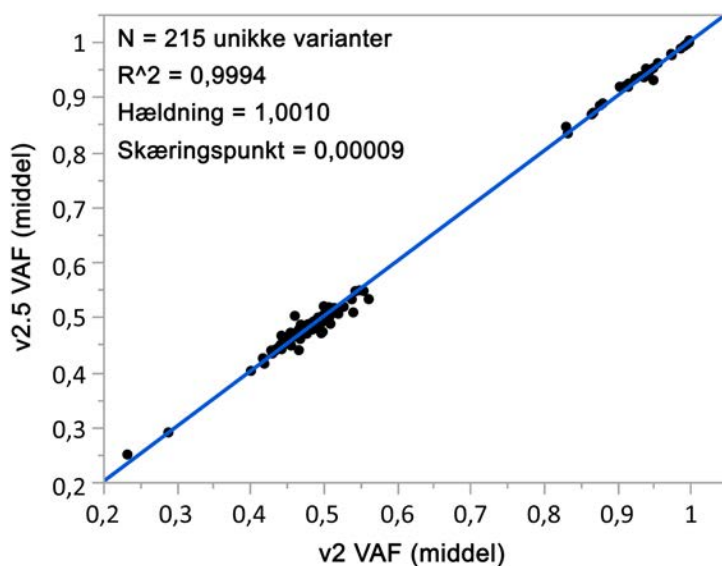
²C95-værdier, der er baseret på Standardafvigelser for prøven.

Metodesammenligning (reagenskit)

Kimbane

De gennemsnitlige VAF-værdier fra 215 unikke varianter blev evalueret på tværs af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) vha. de resultater, der blev genereret af kimbanevariantmodulet. De gennemsnitlige VAF-værdier blev beregnet fra 11 sekventeringskørsler (v2.5) og én sekventeringskørsel (v2). Der blev brugt mindst otte replikater til at beregne gennemsnittet for hver enkelt variant. **Figur 3** illustrerer VAF-korrelationen mellem de to reagenskits. Baseret på den stærke lineære VAF-korrelation og ligheden i resultater mellem reagenskits er det blevet bestemt, at ydelsesegenskaberne, der indledningsvist blev godkendt og valideret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) med kimbanevariantmodulet, gælder NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

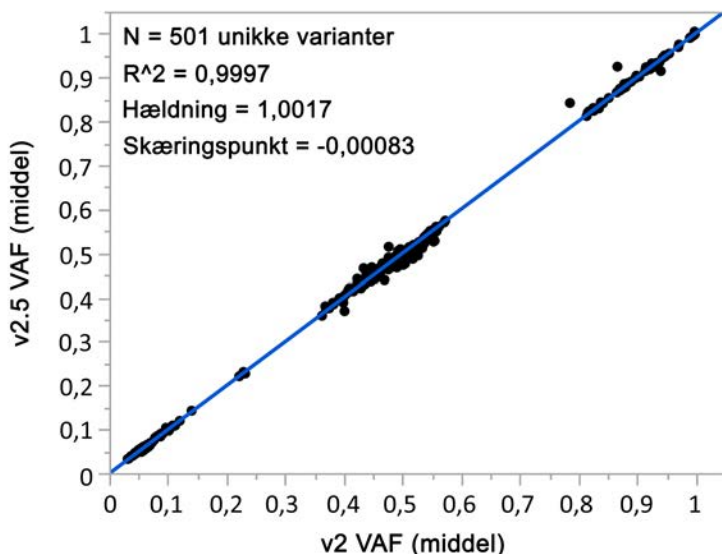
Figur 3 Kimbanevariantmodulet: VAF-korrelationen (Variant Allele Frequency) mellem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Somatisk

De gennemsnitlige VAF-værdier for 501 unikke varianter blev evalueret på tværs af NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) vha. de resultater, der blev genereret af det somatiske variantmodulet. De gennemsnitlige VAF-værdier blev beregnet fra 11 sekventeringskørsler (v2.5) og én sekventeringskørsel (v2). Der blev brugt mindst tre replikater til at beregne gennemsnittet for hver unikke variant. [Figur 4](#) illustrerer VAF-korrelationen mellem de to reagenskits. Baseret på VAF-korrelationen og ligheden i resultater mellem reagenskits er det blevet bestemt, at ydelsesegenskaberne, der blev godkendt og valideret med NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) med det somatiske variantmodulet, gælder NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).

Figur 4 Det somatiske variantmodul: VAF-korrelationen (Variant Allele Frequency) mellem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cycles) og NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles).



Patenter og varemærker

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

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

Kontaktoplysninger



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



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

Australsk sponsor

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

Produktmærkning

Se forklaringer på de symboler, der fremgår af produktemballagen og -mærkningen, i symbolnøglen på support.illumina.com under fanen *Documentation and Literature* (Dokumentation og litteratur) for dit sæt.