

NextSeq™ 550Dx-Gerät

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

NUR FÜR DEN EXPORT

Katalog-Nr. 20005715

Bestimmungsgemäße Verwendung

Das NextSeq 550Dx-Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken bei Verwendung von *In-vitro*-Diagnose-Assays vorgesehen. Das NextSeq 550Dx-Gerät darf nur mit *In-vitro*-Diagnose-Reagenzien und Analysesoftware verwendet werden, die spezifisch registriert, zertifiziert oder zugelassen sind.

Verfahrensprinzipien

Das Illumina NextSeq 550Dx-Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken mit *In-vitro*-Diagnostik-Assays vorgesehen. Für die Zugabe nutzt das NextSeq 550Dx aus DNA vorbereitete Bibliotheken, bei denen amplifizierten Targets Probenindizes und Erfassungssequenzen hinzugefügt werden. Die Probenbibliotheken werden auf einer Fließzelle erfasst und auf dem Gerät unter Verwendung von SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) sequenziert. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Die Echtzeitanalyse-Software (RTA) führt die Bildanalyse sowie das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zu. Nach Abschluss der Primäranalyse kann die Sekundäranalyse auf dem Gerät ausgeführt werden, um Base-Calls zu verarbeiten. Das NextSeq 550Dx-Gerät verwendet je nach Workflow verschiedene Module für die Sekundäranalyse. Bei den Modulen für Keimbahn- und somatische Varianten umfasst die Verarbeitung das Demultiplexing, die Generierung von FASTQ-Dateien, das Alignment, das Varianten-Calling und die Generierung von VCF- sowie gVCF-Dateien (Varianten-Call-Format bzw. genomisches Varianten-Call-Format). Die VCF- und gVCF-Dateien enthalten Informationen zu Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

Dual-Boot-Konfiguration

Das NextSeq 550Dx verfügt über eine Dual-Boot-Konfiguration, die es ermöglicht, das Gerät entweder im Dx-Modus (Diagnose) oder im RUO-Modus (nur für Forschungszwecke) zu betreiben. Sequenzierungsassays für die *In-vitro*-Diagnostik, einschließlich der Module für Keimbahn- und somatische Varianten, werden im Diagnosemodus durchgeführt. Im Diagnosemodus können nur IVD-Sequenzierungsreagenzien verwendet werden. Die Leistungsmerkmale und Verfahrenseinschränkungen für das NextSeq 550Dx-Gerät wurden mittels der Module für Keimbahn- und somatische Varianten im Diagnosemodus bestimmt.

Einschränkungen des Verfahrens

- 1 Für *In-vitro*-Diagnostik.
- 2 Die Module für Keimbahn- und somatische Varianten können in Verbindung mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) oder dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) Folgendes leisten:
 - ▶ Sequenzierungsausgabe ≥ 90 Gigabasen (Gb)
 - ▶ Read-Länge (bei Paired-End-Läufen) 2 x 150 Basenpaare (bp)

- ▶ Anteil der Basen mit Q30 oder höher beträgt $\geq 75\%$ bei einer Read-Länge von 2×150 bp
75 % der Basen oder mehr haben Qualitäts-Scores auf der Phred-Skala von ≥ 30 , was auf eine Base-Call-Genauigkeit von über 99,9 % hindeutet.
- 3 Reads mit Indels (Insertionen, Deletionen und Kombinationen daraus), deren Inhalt eine Länge von mehr als 25 Basenpaaren (bp) aufweist, werden von der Assay-Software nicht aligniert. Folglich können Indels mit einer Länge > 25 bp von der Assay-Software nicht identifiziert werden.
- 4 Möglicherweise werden Amplikon-Reads mit extremen Varianteninhalten von der Assay-Software nicht aligniert, was dann dazu führen kann, dass die Region als Wildtyp gemeldet wird. Zu extremen Inhalten gehören:
 - ▶ Reads mit mehr als drei Indels
 - ▶ Reads mit einer Länge von mindestens 30 bp und einem SNV-Inhalt (Single Nucleotide Variant, Einzelnukleotidvariante) von mehr als 4 % der Gesamtlänge des Amplikon-Targets (ohne Sondenregionen)
 - ▶ Reads mit einer Länge von < 30 bp und einem SNV-Gehalt von $> 10\%$ der Gesamtlänge des Amplikons (einschließlich Sondenregionen)
- 5 Große Varianten wie Mehrfachnukleotidvarianten (MNV) und große Indels werden in der Ausgabe-VCF-Datei möglicherweise als separate kleinere Varianten aufgeführt.
- 6 Deletions-Varianten werden ggf. herausgefiltert oder verpasst, wenn sie zwei Amplikons auf der Platte umfassen und die Länge der Deletion der Überlappung der beiden Amplikons entspricht oder diese übertrifft.
- 7 Das System kann keine Indels erkennen, wenn diese unmittelbar an einen Primer angrenzend auftreten und es kein überlappendes Amplikon gibt. Der Assay kann in Regionen mit überlappenden Amplikons Deletionen nicht erkennen, wenn die überlappende Region kleiner als die zu erkennende Deletion ist. Wenn es sich bei der überlappenden Region zwischen zwei angrenzenden Amplikons beispielsweise um zwei Basen handelt, kann der Assay keine Deletionen erkennen, die beide Basen umfassen. Die Deletion einer einzelnen dieser Basen kann erkannt werden.
- 8 Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Workflow zur Bibliotheksvorbereitung können zugrundeliegende Polymorphismen, Mutationen, Insertionen oder Deletionen in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und die Anzahl der während der Sequenzierung erfolgten Calls beeinträchtigen. Beispiele:
 - ▶ Eine Variante in der Phase mit einer Variante in der Primer-Region wird möglicherweise nicht amplifiziert, was zu einem falsch negativen Ergebnis führt.
 - ▶ Varianten in der Primer-Region könnten die Amplifikation des Referenz-Allels verhindern, was zu einem fehlerhaften homozygoten Varianten-Call führt.
 - ▶ Indel-Varianten in der Primer-Region können an dem an den Primer angrenzenden Read-Ende zu einem falsch positiven Call führen.
- 9 Indels können aufgrund von Strangverzerrungen herausgefiltert werden, wenn sie in der Nähe eines Read-Endes auftreten und während des Alignments einem Soft-Clipping unterzogen werden.
- 10 Kleine MNVs wurden nicht validiert und werden nur im Modul für somatische Varianten gemeldet.
- 11 Deletionen werden in der VCF-Datei unter der Koordinate der vorhergehenden Base gemäß VCF-Format gemeldet. Daher muss bei angrenzenden Varianten vor dem Melden berücksichtigt werden, dass ein einzelner Base-Call eine homozygote Referenz ist.
- 12 Keimbahn-spezifische Einschränkungen:
 - ▶ Unter Verwendung des Local Run Manager-Moduls für Keimbahn-Varianten für NextSeq 550Dx ist das NextSeq 550Dx-Gerät darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Keimbahn-Varianten-Calling (z. B. homozygote, heterozygote oder Wildtyp-Ergebnisse) zu liefern.
 - ▶ Bei Verwendung in Kombination mit dem Keimbahn-Varianten-Modul beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindestabdeckung pro Amplikon das 150-Fache. Daher werden 150 DNA-Fragmente benötigt, was 300 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Abdeckung. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Abdeckung beeinträchtigen.
 - ▶ Kopienzahlvarianten haben einen Einfluss darauf, ob eine Variante als homozygot oder heterozygot identifiziert wird.

- ▶ Varianten in bestimmten repetitiven Kontexten werden in den VCF-Dateien herausgefiltert. Der RMxN-Wiederholungsfiler wird verwendet, um Varianten zu filtern, wenn die gesamte oder ein Teil der Variantensequenz im Referenzgenom angrenzend an die Variantenposition wiederholt vorkommt. Beim Keimbahn-Varianten-Calling sind mindestens neun Wiederholungen in der Referenz notwendig, damit Varianten gefiltert werden. Dabei werden nur Wiederholungen mit Längen von bis zu 5 bp (R5 x 9) berücksichtigt.
- ▶ Ein Indel und eine SNV an einem einzelnen Locus kann dazu führen, dass nur eine Variante gemeldet wird.

13 Spezifische Einschränkungen für somatische Varianten.

- ▶ Unter Verwendung des Local Run Manager-Moduls für somatische Varianten für NextSeq 550Dx ist das NextSeq 550Dx-Gerät darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von somatischen Varianten (z. B. das Vorhandensein einer somatischen Variante mit einer Variantenhäufigkeit von $\geq 0,026$ mit einer Nachweisgrenze von 0,05) zu liefern.
- ▶ Bei Verwendung in Kombination mit dem Modul für somatische Varianten beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindestabdeckung pro Amplikon das 450-Fache pro Oligonukleotid-Pool. Daher werden pro Oligonukleotid-Pool 450 DNA-Fragmente benötigt, was 900 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Abdeckung. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Abdeckung beeinträchtigen.
- ▶ Beim Calling somatischer Varianten werden Varianten nur dann gefiltert, wenn mindestens sechs Wiederholungen in der Referenz vorhanden sind. Dabei werden nur Wiederholungen mit Längen von bis zu 3 bp (R3 x 6) berücksichtigt.
- ▶ Das Modul für somatische Varianten kann nicht zwischen Keimbahn- und somatischen Varianten unterscheiden. Das Modul ist darauf ausgelegt, Varianten über einen Bereich von Variantenhäufigkeiten hinweg zu erkennen. Jedoch kann die Variantenhäufigkeit nicht dazu verwendet werden, um somatische Varianten von Keimbahn-Varianten zu unterscheiden.
- ▶ Normales Gewebe in der Probe beeinträchtigt die Erkennung von Varianten. Die gemeldete Nachweisgrenze basiert auf einer Variantenhäufigkeit bezogen auf die Gesamt-DNA, die aus dem Tumor und aus normalem Gewebe extrahiert wurde.

Produktkomponenten

- 1 NextSeq 550Dx-Gerät (Katalog-Nr. 20005715)
- 2 Die Software für das NextSeq 550Dx-Gerät umfasst folgende Komponenten:

Software-Anwendung	Funktion	Beschreibung
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Steuert den Betrieb des Geräts.	Die NOS-Softwareanwendung steuert den Betrieb des Geräts während der Sequenzierung und generiert Bilder, die anschließend von der Echtzeitanalyse-Software (RTA) verwendet werden.
Echtzeitanalyse-Software (RTA)	Führt die Primäranalyse durch.	Die RTA-Softwareanwendung konvertiert die von der NOS für jede Platte pro Zyklus des Sequenzierungslaufs erzeugten Bilder in Base-Call-Dateien. Diese werden anschließend von den Local Run Manager-Analysenmodulen verarbeitet. Die RTA-Softwareanwendung hat keine Benutzeroberfläche.
Local Run Manager	Benutzeroberfläche für die Modulauswahl	Die Local Run Manager-Software ist eine im Gerät integrierte Lösung für die Benutzerverwaltung, die Auswahl des entsprechenden Analysemoduls und die Statusüberwachung.

Software-Anwendung	Funktion	Beschreibung
Modul für somatische Varianten	Führt die Sekundäranalyse durch.	Dieses Local Run Manager-Analysemodul verarbeitet Base-Calls über die Sekundäranalyse. Die Verarbeitung umfasst das Demultiplexing, die Generierung von FASTQ-Dateien, das Alignment, das Varianten-Calling und die Berichterstellung. Der Varianten-Caller (Pisces) generiert VCF-Dateien mit Informationen zu Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden. In den Dateien wird auch die festgestellte Variantenhäufigkeit protokolliert.
Modul für Keimbahn-Varianten	Führt die Sekundäranalyse durch.	Dieses Local Run Manager-Analysemodul verarbeitet Base-Calls über die Sekundäranalyse. Die Verarbeitung umfasst das Demultiplexing, die Generierung von FASTQ-Dateien, das Alignment, das Varianten-Calling und die Berichterstellung. Der Varianten-Caller (Pisces) generiert VCF-Dateien mit Informationen zu Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden, und identifiziert jede Variante als heterozygot oder homozygot.

Betriebsbedingungen

Umgebungsfaktor	Spezifikation
Temperatur	Die Labortemperatur muss 19 °C bis 25 °C (22 °C ± 3 °C) betragen. Diese Temperatur ist die Betriebstemperatur des Geräts. Während eines Laufs darf die Umgebungstemperatur nicht um mehr als ± 2 °C schwanken.
Luftfeuchtigkeit	Es muss eine relative, nicht kondensierende Luftfeuchtigkeit zwischen 20 % und 80 % aufrechterhalten werden.

Geräte und Materialien

Erforderliche, separat erhältliche Geräte und Materialien

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen), Katalog-Nr. 20019554

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen), Katalog-Nr. 20028871

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für Sequenzierungsläufe

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	VWR, Katalog-Nr. 95041-714 (oder vergleichbar) Allgemeiner Laborlieferant	Reinigung der Fließzelle und allgemeine Verwendung
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalog-Nr. 21905-026 (oder vergleichbar)	Reinigung der Fließzelle und allgemeine Verwendung

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für die Gerätewartung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
NaOCl, 5 % (Natriumhypochlorit)	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305 (oder vergleichbares Produkt in Laborqualität)	Waschen des Geräts mithilfe des manuellen Nachwaschlaufs; verdünnt auf 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Waschen des Geräts mit manuellen Waschoptionen; verdünnt auf 0,05 %
Wasser, Laborqualität	Allgemeiner Laborlieferant	Waschen des Geräts (manueller Waschlauf)

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Luftfilter	Illumina, Katalog-Nr. 20022240	Reinigen der Luft, die das Gerät zur Kühlung aufnimmt

Richtlinien für Wasser in Laborqualität

Bei Geräteverfahren sollte immer deionisiertes Wasser bzw. Wasser in Laborqualität verwendet werden. Verwenden Sie niemals Leitungswasser. Verwenden Sie nur die folgenden oder äquivalente Wasserarten:

- ▶ Deionisiertes Wasser
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18-Megohm-(MΩ)-Wasser
- ▶ Milli-Q-Wasser
- ▶ Super-Q-Wasser
- ▶ Wasser in Molekularbiologie-Qualität

Warn- und Vorsichtshinweise



VORSICHT

Gemäß geltender Gesetze ist der Verkauf oder die Nutzung dieses Geräts nur über einen Arzt bzw. im Auftrag eines Arztes oder einer anderen Fachperson mit entsprechender Lizenz zulässig.

- 1 **Einige Komponenten der von Illumina bereitgestellten Reagenzien für das NextSeq 550Dx-Gerät enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften.** Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.
- 2 Handhaben Sie alle Blutproben so, als wären sie mit HIV (Humanes Immundefizienzvirus), HBV (Humanes Hepatitis-B-Virus) oder anderen über das Blut übertragenen Erregern infiziert (allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen).
- 3 Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Probenqualität führen.
- 4 Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien gründlich die Hände.
- 5 Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Instrumenten und Proben genomischer DNA durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- 6 Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontamination sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über eigene Geräte und Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Hitzeblöcke, Vortexer und Zentrifugen) verfügen.
- 7 Die Index-zu-Proben-Paarung muss genau dem ausgedruckten Platten-Layout entsprechen. Local Run Manager füllt die Index-Primer automatisch mit den zugehörigen Probenamen aus, wenn diese in das Modul eingegeben werden. Dem Benutzer wird empfohlen, die mit Proben verbundenen Index-Primer zu überprüfen, bevor er den Sequenzierungslauf startet. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.
- 8 Es wird dringend empfohlen, eine (vom Benutzer bereitzustellende) Virenschutz-Software zu installieren, um den Computer vor Viren zu schützen. Installationsanweisungen finden Sie im Benutzerhandbuch.

- 9 Betreiben Sie das NextSeq 550Dx-Gerät nicht, wenn ein Gehäuseteil entfernt wurde. Wenn Sie das Gerät betreiben, während eines oder mehrere Gehäuseteile entfernt sind, sind Sie möglicherweise Netz- und Gleichstromspannungen ausgesetzt.
- 10 Berühren Sie nicht den Fließzellentisch in der Fließzellenkammer. Das Heizelement in der Kammer arbeitet bei 22 °C bis 95 °C, sodass es zu Verbrennungen kommen kann.
- 11 Das Gerät wiegt ca. 84 kg und kann schwere Verletzungen verursachen, wenn es fallen gelassen oder falsch behandelt wird.

Gebrauchsanweisung

Die folgende Gebrauchsanweisung gilt für die Ausführung des Moduls für Keimbahn-Varianten und des Moduls für somatische Varianten im Diagnosemodus auf dem NextSeq 550Dx-Gerät bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) oder des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen).

Eingeben von Laufinformationen

Detaillierte Anweisungen finden Sie im Referenzhandbuch zum NextSeq 550Dx-Gerät (Dokument-Nr. 1000000009513) und im Handbuch des entsprechenden Local Run Manager-Moduls.

Festlegen von Parametern

- 1 Melden Sie sich bei Local Run Manager an.
- 2 Wählen Sie **Create Run** (Lauf erstellen) und dann **Somatic Variant** (Somatische Varianten) oder **Germline Variant** (Keimbahn-Varianten).
- 3 Geben Sie einen Namen ein, mit dem der Lauf von der Sequenzierung bis zur Analyse identifiziert werden kann.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Leerzeichen, Unterstriche oder Bindestriche.
- 4 **[Optional]** Geben Sie eine Laufbeschreibung ein, die hilft, den Lauf zu identifizieren.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Leerzeichen, Unterstriche oder Bindestriche.
- 5 Wählen Sie die Anzahl der Proben und das Index-Set aus der Dropdown-Liste aus.
Beachten Sie Folgendes, wenn Sie eine Auswahl treffen.
 - ▶ In der Dropdown-Liste wird die Anzahl der Proben zusammen mit einem Index-Set aufgeführt. „24-Set 1“ gibt z. B. Folgendes an: 24 zu testende Proben mit Indizes aus Index-Set 1.
 - ▶ Die Index-Set-Nummern beziehen sich auf verschiedene Sets von i5- und i7-Indexpaaren. Sowohl Set 1 als auch Set 2 bieten Index-Diversität. Es werden zwei Index-Sets angeboten, um zu verhindern, dass ein einzelnes Set aufgebraucht wird.
 - ▶ Wählen Sie die Anzahl der Proben, die der Anzahl der zu testenden Proben am nächsten ist. Wenn die genaue Anzahl der Proben, die Sie testen, nicht aufgeführt ist, wählen Sie die nächstkleinere Zahl. Wenn Sie beispielsweise 18 Proben testen möchten, wählen Sie 16 Proben aus.
 - ▶ Empfohlene Proben-Wellen und Index-Kombinationen, die die Anforderungen an die Index-Diversität erfüllen, werden grün hervorgehoben.

Importieren von Manifestdateien für den Lauf

- 1 Stellen Sie sicher, dass die gewünschten Manifestdateien an einem zugänglichen Netzwerkspeicherort oder auf einem USB-Laufwerk verfügbar sind.
- 2 Wählen Sie **Import Manifests** (Manifeste importieren).
- 3 Navigieren Sie zur Manifestdatei und wählen Sie die Manifeste aus, die Sie hinzufügen möchten.



HINWEIS

Um Manifestdateien für alle Läufe verfügbar zu machen, die das Analysemodul für Keimbahn- bzw. somatische Varianten verwenden, fügen Sie die Dateien über die Funktion „Module Settings“ (Moduleinstellungen) hinzu. Für diese Funktion werden Administratorrechte benötigt. Weitere Informationen finden Sie im *Referenzhandbuch zum NextSeq 550Dx-Gerät (Dokument-Nr. 1000000009513)*.

Angeben der Proben für den Lauf

Wählen Sie eine der folgenden Optionen, um die Proben für den Lauf festzulegen, und führen Sie die entsprechenden Schritte durch.

- ▶ **Enter samples manually** (Manuelles Eingeben der Proben): Verwenden Sie die leere Tabelle auf dem Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen).
- ▶ **Import samples** (Importieren von Proben): Navigieren Sie zu einer externen Datei mit kommagetrennten Werten (*.csv). Im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) steht eine Vorlage zum Herunterladen zur Verfügung.

Manuelles Eingeben der Proben

- 1 Geben Sie einen eindeutigen Probennamen (**Analysemodul für somatische Varianten**) oder eine eindeutige Proben-ID (**Analysemodul für Keimbahn-Varianten**) ein.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Bindestriche oder Unterstriche.
- 2 **[Optional]** Bei positiven oder negativen Kontrollproben klicken Sie mit der rechten Maustaste und wählen Sie den Kontrolltyp aus.
Die Kontrollprobe in einem Proben-Well wird automatisch für den entsprechenden Well in dem anderen Pool übernommen.
- 3 **[Optional]** Geben Sie im Feld „Sample Description“ (Probenbeschreibung) eine Probenbeschreibung ein.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Bindestriche oder Unterstriche.
- 4 Wählen Sie einen Index-1-Adapter aus der Dropdown-Liste „Index 1 (i7)“ aus.
Wenn Sie vorgeschlagene Proben-Wells verwenden, füllt die Software automatisch die i7- und i5-Indexadapter aus, die den Anforderungen an die Index-Diversität entsprechen. Wenn die genaue Anzahl der Proben, die Sie testen, nicht aufgeführt ist, achten Sie darauf, Indexadapter für zusätzliche Wells auszuwählen.
- 5 Wählen Sie einen Index-2-Adapter aus der Dropdown-Liste „Index 2 (i5)“ aus.
- 6 Wählen Sie eine Manifestdatei aus der Dropdown-Liste „Manifest“ aus.
Proben im Pool A erfordern ein anderes Manifest als Proben im Pool B.
- 7 Wählen Sie eine der folgenden Optionen zum Anzeigen, Drucken oder Speichern des Plattenlayouts, sodass es bei der Vorbereitung von Bibliotheken als Referenz zur Verfügung steht:
 - Wählen Sie das Symbol **Print** (Drucken), um das Plattenlayout anzuzeigen. Wählen Sie **Print** (Drucken), um es auszudrucken.
 - Wählen Sie **Export** (Exportieren), um Probeninformationen in eine externe Datei zu exportieren.
- 8 Wählen Sie **Save Run** (Lauf speichern).

Importieren von Proben

- 1 Wählen Sie **Import Samples** (Proben importieren) und navigieren Sie zum Speicherort der Datei mit den Probeninformationen. Sie können zwei Dateitypen importieren.
 - Wählen Sie auf dem Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) die Option **Template** (Vorlage), um ein neues Plattenlayout zu erstellen. Die Vorlagendatei enthält die korrekten Spaltenüberschriften für den Import. Tragen Sie in jeder Spalte Informationen zu den Proben im Lauf ein. Löschen Sie die Probeninformationen in nicht genutzten Zellen und speichern Sie anschließend die Datei.
 - Verwenden Sie eine Datei mit Probeninformationen, die mittels der Export-Funktion aus dem Analysemodul für somatische Varianten bzw. für Keimbahn-Varianten exportiert wurde.
- 2 Wählen Sie das Symbol **Print** (Drucken), um das Plattenlayout anzuzeigen.
- 3 Wählen Sie **Print** (Drucken), um das Plattenlayout auszudrucken, damit es bei der Vorbereitung von Bibliotheken als Referenz zur Verfügung steht.

- 4 Wählen Sie **Save Run** (Lauf speichern).

Vorbereiten der Reagenzienkartusche

Befolgen Sie die Anweisungen zur Reagenzienkartusche sorgfältig, um eine erfolgreiche Sequenzierung zu gewährleisten.

- 1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
- 2 Wählen Sie eine der folgenden Methoden zum Auftauen der Reagenzien. Tauchen Sie die Kartusche nicht in Wasser. Trocknen Sie die Kartusche nach dem Auftauen ab, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Temperatur	Auftauzeit	Stabilitätsgrenze
Wasserbad bei 15 °C bis 30 °C	60 Minuten	Nicht länger als 6 Stunden
2 °C bis 8 °C	7 Stunden	Nicht länger als 5 Tage



HINWEIS

Wenn mehrere Kartuschen im selben Wasserbad aufgetaut werden, verlängert sich die Auftauzeit.

- 3 Invertieren Sie die Kartusche fünfmal, um die Reagenzien zu mischen.
- 4 Untersuchen Sie den Boden der Kartusche, um sicherzustellen, dass die Reagenzien aufgetaut und frei von Ausfällungen sind. Vergewissern Sie sich, dass die Positionen 29, 30, 31 und 32 aufgetaut sind. Sie sind größer als die anderen und haben die längste Auftaudauer.
- 5 Klopfen Sie leicht auf den Tisch, um die Anzahl der Luftblasen zu verringern. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

Vorbereiten der Fließzelle

- 1 Nehmen Sie einen neuen Fließzellenkarton aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C.
- 2 Entfernen Sie die Folienverpackung des Kartons und legen Sie ihn für 30 Minuten bei Raumtemperatur beiseite.

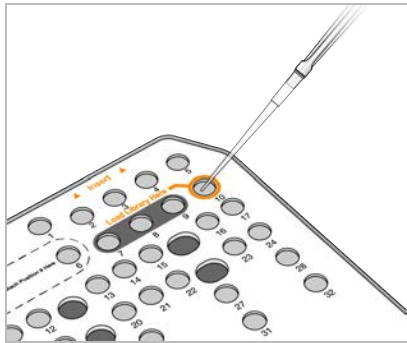
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung

Denaturieren und verdünnen Sie Ihre Bibliotheken auf ein Ladevolumen von 1,3 ml. In der Praxis kann die Ladekonzentration je nach Bibliotheksvorbereitungs- und Quantifizierungsmethode variieren. Die Verdünnung von Probenbibliotheken hängt von der Komplexität der Oligonukleotid-Pools ab. Eine Anleitung zur Vorbereitung von Probenbibliotheken für die Sequenzierung, einschließlich der Verdünnung und des Poolings von Bibliotheken, finden Sie in der Gebrauchsanweisung im Abschnitt für die entsprechende Bibliotheksvorbereitungskit. Es ist erforderlich, die Clusterdichte auf dem NextSeq 550Dx zu optimieren.

Laden der Bibliotheken in die Reagenzienkartusche

- 1 Reinigen Sie die Verschlussfolie, die den mit **Load Library Here** (Bibliothek hier laden) beschrifteten Behälter 10 abdeckt, mit einem fussselfreien Tuch.
- 2 Durchstechen Sie die Folie mit einer sauberen 1-ml-Pipettenspitze.
- 3 Geben Sie 1,3 ml der vorbereiteten Bibliotheken in Behälter Nr. 10 mit dem Namen **Load Library Here** (Bibliothek hier laden). Achten Sie beim Zuführen der Bibliotheken darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.

Abbildung 1 Laden der Bibliotheken



Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs

- 1 Melden Sie sich mit Ihrem Kennwort für Local Run Manager beim NextSeq 550Dx-Gerät an.
- 2 Wählen Sie im Startbildschirm der NOS-Software die Option **Sequence** (Sequenzieren).
- 3 Wählen Sie einen Lauf aus der Liste aus und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).
Die folgenden Laufkonfigurationsbildschirme werden nacheinander geöffnet: „Load Flow Cell“ (Fließzelle laden), „Load Buffer Cartridge“ (Pufferkartusche laden), „Load Reagent Cartridge“ (Reagenzienkartusche laden) und „Pre-Run Check“ (Selbsttest).
- 4 Wenn der Bildschirm „Load Flow Cell“ (Fließzelle laden) angezeigt wird, reinigen und laden Sie die Fließzelle.
 - ▶ Nehmen Sie die Fließzelle aus der Folienverpackung.
 - ▶ Öffnen Sie die klare, aufklappbare Plastikverpackung und nehmen Sie die Fließzelle heraus.
 - ▶ Reinigen Sie die Glasoberfläche der Fließzelle mit einem fusselfreien Alkoholtupfer. Trocknen Sie das Glas mit einem fusselfreien Labortuch.
 - ▶ Vergewissern Sie sich, dass die Glasoberfläche der Fließzelle sauber ist. Wiederholen Sie gegebenenfalls den Reinigungsschritt.
 - ▶ Entfernen Sie die gebrauchte Fließzelle aus dem vorherigen Lauf.
 - ▶ Richten Sie die gebrauchte Fließzelle über den Ausrichtungsstiften aus und legen Sie sie auf den Fließzellentisch.
- 5 Wählen Sie **Load** (Laden).
Die Tür wird automatisch geschlossen, die Fließzellen-ID wird angezeigt und die Sensoren sind markiert.
- 6 Befolgen Sie die Anweisungen der Software, um den Behälter mit den verbrauchten Reagenzien zu leeren, laden Sie die NextSeq 550Dx-Pufferkartusche und laden Sie die NextSeq 550Dx-Reagenzienkartusche.
Wenn die NextSeq 550Dx-Pufferkartusche und -Reagenzienkartusche geladen sind, liest die Software die RFID ein. Die IDs der Pufferkartusche und Reagenzienkartusche werden auf dem Bildschirm angezeigt und die Sensoren werden überprüft.
- 7 Wählen Sie nach Abschluss des automatisierten Selbsttests **Start**. (Nicht erforderlich, falls für automatischen Start konfiguriert.)
- 8 Wenn der Lauf beginnt, wird der Sequenzierungsbildschirm geöffnet. Dieser Bildschirm bietet eine visuelle Darstellung des aktuellen Laufs, einschließlich Intensitäten und Qualitäts-Scores (Q-Scores).

Ergebnisse

Die Echtzeitanalyse (RTA) ist eine integrierte Software, die die Bildanalyse sowie das Base-Calling durchführt und jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zuweist. Wenn die Primäranalyse abgeschlossen ist, beginnt das ausgewählte Local Run Manager-Modul auf dem NextSeq 550Dx-Gerät automatisch mit der Sekundäranalyse. Die hier beschriebenen Sekundäranalyseverfahren beziehen sich auf die Module für Keimbahn- und somatische Varianten.

Demultiplexing

Beim Demultiplexing wird jede Index-Read-Sequenz mit den für den Lauf angegebenen Indexsequenzen verglichen. In diesem Schritt werden keine Qualitätswerte berücksichtigt.

Index-Reads werden wie folgt identifiziert:

- ▶ Die Proben sind gemäß der Reihenfolge, in der sie für den Lauf aufgelistet sind, und mit 1 beginnend durchnummeriert.
- ▶ Die Probennummer 0 ist für Cluster reserviert, die keiner Probe zugeordnet wurden.
- ▶ Cluster werden einer Probe zugewiesen, wenn die Indexsequenz genau übereinstimmt bzw. je Index-Read maximal eine Nichtübereinstimmung festgestellt wird.

Generieren von FASTQ-Dateien

Nach dem Demultiplexing generiert die Software temporäre Analysedateien im FASTQ-Format, dem Textformat für die Darstellung von Sequenzen. FASTQ-Dateien enthalten die Reads jeder Probe und die entsprechenden Qualitäts-Scores. Cluster, die den Filter nicht passiert haben, werden nicht aufgenommen.

Jede FASTQ-Datei enthält nur die Reads einer Probe. Der Name der Probe ist Bestandteil des FASTQ-Dateinamens. In den Modulen für Keimbahn- und somatische Varianten können acht FASTQ-Dateien pro Probe und Oligo-Pool generiert werden, vier aus Read 1 und vier aus Read 2. Diese Ausgabe ergibt für Keimbahn-respektive somatische Varianten insgesamt 8 und 16 FASTQ-Dateien pro Probe. FASTQ-Dateien sind die primären Eingabedateien für das Alignment.

Alignment

Beim Alignment werden Cluster von jeder Probe mithilfe eines beschränkten („banded“) Smith-Waterman-Algorithmus an den in der Manifestdatei angegebenen Amplikon-Sequenzen aligniert.

Der „banded“ Smith-Waterman-Algorithmus führt semiglobale Sequenz-Alignments durch, um ähnliche Regionen zwischen zwei Sequenzen zu ermitteln. Statt die gesamte Sequenz zu betrachten, vergleicht der Smith-Waterman-Algorithmus Segmente aller möglichen Längen.

Jeder Paired-End-Read wird in Bezug auf sein Alignment mit den entsprechenden SONDENSEQUENZEN dieses Reads untersucht.

- ▶ Read 1 wird anhand des umgekehrten Komplements der stromabwärts gelegenen lokusspezifischen Oligos (Downstream Locus-Specific Oligos, DLSO) beurteilt.
- ▶ Read 2 wird anhand der stromaufwärts gelegenen lokusspezifischen Oligos (Upstream Locus-Specific Oligos, ULSO) bewertet.
- ▶ Wenn der Beginn eines Reads mit einer SONDENSEQUENZ dahin gehend übereinstimmt, dass er maximal drei Unterschiede (Nichtübereinstimmungen oder Verschiebungen aufgrund vorangehender Indels) aufweist, wird die volle Länge des Reads mit dem Amplikon-Ziel dieser Sequenz aligniert.
- ▶ Indels innerhalb der DLSO und ULSO werden aufgrund der Assay-Chemie nicht beobachtet.

Die Alignments werden nach den Nichtübereinstimmungsraten über die Region von Interesse oder das gesamte Amplikon hinweg - je nach Länge des Amplikons - aus den Alignment-Ergebnissen herausgefiltert. Die herausgefilterten Alignments werden als „nicht aligniert“ in Alignment-Dateien protokolliert und beim Varianten-Calling nicht berücksichtigt.

Varianten-Calling

Der Varianten-Caller (Pisces) ist für das Calling von SNV- und Indel-Varianten aus für das Gerät vorbereiteten Bibliotheken konzipiert.

Berichte und zusätzliche Ausgabedateien

Die Variantenanalysemodule erstellen Berichte mit Kennzahlen, z. B. Sequenzierungstiefe und Anzahl der Varianten, in PDF- und tabulatorgetrennten Textdateien (*.txt). Die Module generieren außerdem Ausgabedateien, wie VCF- und gVCF-Dateien (genomisches Varianten-Call-Format) für Varianten-Calling-Anwendungen.

Verfahren zur Qualitätskontrolle

Die NextSeq 550Dx-Software wertet jeden Lauf, jede Probe und jeden Base-Call anhand von Qualitätskontrollkennzahlen aus. Es wird empfohlen, auch positive und negative Kontrollproben in die Bibliotheksvorbereitung einzubeziehen und zu evaluieren. Bewerten Sie die Kontrollproben wie folgt:

- **Negative Kontrollprobe (No Template Control) oder andere Negativkontrolle:** Muss das erwartete Ergebnis erzeugen. Wenn die negative Kontrollprobe ein anderes als das erwartete Ergebnis generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten oder es hat eine Kontamination stattgefunden.
- **Positive Kontrollprobe:** Muss das erwartete Ergebnis erzeugen. Wenn die positive Kontrollprobe ein anderes als das erwartete Ergebnis generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten.

Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale für das NextSeq 550Dx-Gerät wurden mittels der Module für Keimbahn- und somatische Varianten mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) bestimmt und mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bestätigt. Die Studien umfassten Probenindizierung, Probenverschleppung, DNA-Zugabe, analytische Sensitivität (Leerwertgrenze/Nachweisgrenze), Genauigkeit und Präzision sowie Methodenvergleich und Reproduzierbarkeit.

Die analytischen Studien mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) wurden für die Überprüfung von zuvor mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) bestimmten Leistungsangaben konzipiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reagenzien-Kits (v2 und v2.5) bei Verwendung des TruSeq Custom Amplicon Kit Dx eine vergleichbare Leistung zeigen. Die Leistungsmerkmale bezüglich voranalytischer Faktoren, z. B. Extraktionsmethoden oder störende Substanzen, finden Sie in der *Packungsbeilage zum TruSeq Custom Amplicon Kit Dx*.

Definitionen von Berechnungen, die bei Leistungsmerkmalen verwendet wurden

- 1 Die positive prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Varianten klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
 - ▶ $(\text{Anzahl der Varianten-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci})$
Vom Assay gemeldete Varianten-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind echt positive Werte (true positives, TP). Als Referenz-Calls oder unterschiedliche Varianten-Calls vom Assay gemeldete Varianten-Loci sind falsch negative Werte (false negatives, FN).
- 2 Die negative prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Wildtyp klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
 - ▶ $(\text{Anzahl der Wildtyp-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci})$
Vom Assay gemeldete Wildtyp-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind echt negative Werte (true negatives, TN). Wildtyp-Loci, die vom Assay als Varianten gemeldet werden, sind falsch positive Werte (false positives, FP).
- 3 Die prozentuale Gesamtübereinstimmung (overall percent agreement, OPA) wird als der Anteil der Loci berechnet, die vom Assay in Bezug auf eine Referenzmethode korrekt gemeldet werden.
 - ▶ $((\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Varianten-Loci}) + (\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Wildtyp-Loci})) / ((\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci}) + (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci}))$

- 4 Die Berechnungen von PPA, NPA und OPA umfassen keine „No Calls“ (Varianten- oder Referenz-Loci, die einen oder mehrere Qualitätsfilter nicht erfüllen).
- 5 Die Call-Rate der Autosomen wird als Gesamtzahl der Loci, die die Filter passieren, geteilt durch die Gesamtzahl der sequenzierten Positionen der Chromosomen 1-22 berechnet. Die Chromosomen X und Y werden nicht einbezogen. Dieser Messwert berücksichtigt nicht die Übereinstimmung der Calls mit der Referenzmethode.

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) – Leistung

Probenindizierung

Proben-Index-Primer, die während einer Bibliotheksvorbereitung hinzugefügt werden, weisen jeder Proben-DNA eine eindeutige Sequenz zu. Durch diese eindeutigen Sequenzen können mehrere Proben in einem einzigen Sequenzierungslauf zusammengefasst werden. Die Probenindizierung wird sowohl beim Workflow für Keimbahn-Varianten als auch beim Workflow für somatische Varianten verwendet. Diese Studie verfolgte das Ziel, die minimale (8) und maximale (96) Anzahl von Proben zu bestimmen, die bei einem einzigen Sequenzierungslauf auf dem NextSeq 550Dx-Gerät verarbeitet werden können. Acht eindeutige Platinum-Genome-Proben wurden mit 12 unterschiedlichen Kombinationen von Index-Primern je Probe getestet. Die Probenergebnisse aus vier Sequenzierungsläufen mit dem Modul für Keimbahn-Varianten wurden mit Platinum Genomes Version 2016-1.0 verglichen.

Im ersten Satz von Läufen wurden 96 eindeutig indizierte Probenbibliotheken mit einem repräsentativen Assay getestet, der für die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen pro Strang über alle 23 menschlichen Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist. Es sollte die Fähigkeit des Assays überprüft werden, für eine bestimmte Probe einen gleichbleibenden Genotypisierungsaufwurf über verschiedene Index-Primer-Kombinationen hinweg vornehmen zu können. Anschließend wurden zwei Sequenzierungsläufe mit acht eindeutig indizierten Probenbibliotheken durchgeführt, um die Mindestzahl der unterstützten Indizes zu ermitteln.

Bei den Läufen mit den 96 indizierten Probenbibliotheken lag die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) bei den SNVs zwischen 98,7 % und 100 %, bei den Insertionen und Deletionen betrug sie 100 %. Alle 96 Indexkombinationen wiesen eine negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) von 100 % auf. Die Läufe mit den acht indizierten Probenbibliotheken wiesen für alle Indexkombinationen PPA-Werte von 100 % (SNVs, Insertionen und Deletionen) und NPA-Werte von 100 % auf.

Probenverschleppung

Das NextSeq 550Dx-Gerät ermöglicht es, mehrere Proben und Kontrollproben in einem einzigen Sequenzierungslauf zu sequenzieren. In einer Studie wurde das Ausmaß der Probenverschleppung in einem Sequenzierungslauf (innerhalb des Laufs) und zwischen Sequenzierungsläufen (von Lauf zu Lauf) untersucht. Zwei Platinum-Genome-Proben, eine männliche und eine weibliche Probe, wurden mit einem repräsentativen Assay untersucht. Dieser ist darauf ausgelegt, verschiedene Gene abzufragen, die 12.588 Basen (150 Amplikons) über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken, einschließlich beider Geschlechtschromosomen. Auf dem NextSeq 550Dx-Gerät erfolgte die Sequenzierung von Bibliotheken mit dem Modul für Keimbahn-Varianten. Die Verschleppung männlicher Proben in weibliche Proben wurde durch das Vorhandensein von Y-Chromosom-Amplikon-Reads in weiblichen Proben festgestellt.

Die Verschleppung innerhalb eines Laufs kann während der Clusterbildung, beim Index-Zyklus-Base-Calling und beim Proben-Demultiplexing auftreten. Zur Untersuchung der Probenverschleppung innerhalb eines Sequenzierungslaufs wurde ein Bibliothekenpool mit je 46 Replikaten der männlichen und weiblichen Proben plus vier Negativkontrollen einmal auf dem NextSeq 550Dx-Gerät sequenziert. Die Probenverschleppung innerhalb des Laufs wurde beurteilt, indem die Y-Chromosom-Amplikon-Abdeckung jedes weiblichen Replikats mit der durchschnittlichen Y-Chromosom-Amplikon-Abdeckung aller männlichen Replikate im Pool verglichen wurde. Die mittlere Verschleppung innerhalb des Laufs lag bei 0,084 %.

Zur Untersuchung der Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurden zwei Bibliothekenpools vorbereitet und nacheinander auf einem NextSeq 550Dx-Gerät sequenziert. Der erste Pool enthielt 46 Replikate der weiblichen Probe plus zwei Negativkontrollen. Der zweite Pool enthielt 46 Replikate der männlichen Probe plus zwei Negativkontrollen. Beide Pools verwendeten den gleichen Satz an Indexadaptern. Der Pool aus weiblichen

Proben wurde zuerst sequenziert, dann folgte ein Sequenzierungslauf mit dem Pool aus männlichen Proben. Anschließend wurde ein erneuter Sequenzierungslauf mit dem Pool aus weiblichen Proben durchgeführt. Die Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurde beurteilt, indem die Y-Chromosom-Amplikon-Abdeckung der entsprechenden Replikate des Wiederholungslaufs des Pools aus weiblichen Proben und des Laufs mit dem Pool aus männlichen Proben miteinander verglichen wurde. Die mittlere Verschleppung von Lauf zu Lauf betrug 0,0076 %.

DNA-Zugabe

Blut (Keimbahn-Varianten-Modul)

Für das NextSeq 550Dx-Gerät wurde der DNA-Zugabebereich bei Blutproben für die Vorbereitung von Bibliotheken mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und dem Workflow des Moduls für Keimbahn-Varianten bestimmt. Hierzu wurde eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 13 Platinum-Genome-Proben und einem repräsentativen Assay durchgeführt, der auf die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist. Die Bibliothek wurde auf zwei NextSeq 550Dx-Geräten mit einer Charge des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert.

Fünf Proben wurden je zweimal bei fünf DNA-Zugabestufen von 250 ng bis 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng und 12 ng) getestet. Acht Proben wurden auf allen fünf DNA-Zugabestufen als Einzelreplikate getestet. Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden Proben-Genotypen mit Platinum Genomes Version 2016-1.0 verglichen. Die Ergebnisse wurden für jede Zugabestufe ermittelt. Die PPA für jeden Variantentyp (SNVs, Insertionen und Deletionen) ist in [Tabelle 1](#) dargestellt; die NPA ist in [Tabelle 2](#) aufgeführt. Alle Zugabestufen hatten eine ähnliche Genauigkeit. Die empfohlene DNA-Zugabe für das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx beträgt 50 ng. 25 ng und 100 ng stellen eine Unter- und Obergrenze für die Erfüllung der Leistungsmerkmale dar.

Tabelle 1 PPA-Ergebnisse für jede DNA-Zugabe nach Variantentyp

DNA-Zugabe (ng)	Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)
12	SNV	2.412	2.381	31	0	98,7
25			2.404	8	0	99,7
50			2.403	9	0	99,6
100			2.412	0	0	100
250			2.412	0	0	100
12	Insertion	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Deletion	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabelle 2 NPA für jede DNA-Zugabe

DNA-Zugabe (ng)	TN	FP	Referenz-No-Calls	NPA (%)
12	430.940	4	26	> 99,9
25	430.936	0	34	100
50	430.936	2	32	> 99,9

100	430.942	0	28	100
250	430.942	0	28	100

FFPE (Somatisch)

Es wurde der DNA-Zugabebereich bei formalinfixierten in Paraffin eingebetteten Proben (FFPE) für die Bibliotheksvorbereitung mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und dem Workflow des Moduls für somatische Varianten für das NextSeq 550Dx-Gerät bestimmt. Hierzu wurde eine Studie zur seriellen Verdünnung mit drei Platinum-Genome-Proben und einem repräsentativen Assay durchgeführt, der auf die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist. Die Platinum-Genome-Zelllinien GM12878 und GM12877 wurden formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde die DNA extrahiert. GM12878 wurde mit GM12877 so verdünnt, dass die Varianten-Allelhäufigkeiten (Variant Allele Frequencies, VAFs) bei 81 Varianten (55 SNVs, 10 Insertionen und 16 Deletionen) annähernd 0,025, 0,05 oder 0,10 betragen. Darüber hinaus wies jede Probe 91 Varianten mit höheren Variantenhäufigkeiten bis zu 1,0 VAF auf. Die Proben wurden je zweimal bei fünf DNA-Zugabestufen und gemäß den Messwerten des TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC-Kits mit einem dCq-Mittelwert (Delta der quantitativen Zyklen) von 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 und 7,8 verarbeitet. Jede Bibliothek wurde auf zwei NextSeq 550Dx-Geräten mit zwei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert. Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden Proben-Varianten-Calls mit Platinum Genomes, Version 2016-1.0 verglichen. Die PPA für jeden Variantentyp (SNVs, Insertionen und Deletionen) ist in [Tabelle 3](#) dargestellt. Die NPA ist in [Tabelle 4](#) aufgeführt. Die empfohlene DNA-Zugabe für Varianten mit einer VAF von 0,05 oder höher beträgt $dCq \leq 4$, wobei 4,6 eine Untergrenze für die Erfüllung der Leistungsmerkmale darstellt.

Tabelle 3 PPA-Ergebnisse für jede DNA-Zugabe nach Variantentyp

dCq-Mittelwert	Variantentyp	Erwartete Varianten	Erwartete No Calls	Zielverdünnung VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Varianten-No-Calls	PPA (%)	Varianten-No-Calls	PPA (%)	Varianten-No-Calls	PPA (%)
2,1	SNV	808	Nicht zutreffend.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Insertion	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Deletion	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabelle 4 NPA für jede DNA-Zugabe

dCq-Mittelwert	Erwarteter Wildtyp	Zielverdünnung VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referenz-No-Calls	NPA (%)	Referenz-No-Calls	NPA (%)	Referenz-No-Calls	NPA (%)
2,1	93.688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1.308	100	1.336	100	784	100
6,0		3.900	> 99,9	3.296	> 99,9	2.996	100
7,8		3.020	> 99,9	2.880	> 99,9	2.448	> 99,9

Analytische Sensitivität (Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) und Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD))

In dieser Studie wurde die Leerwertgrenze (LoB) und Nachweisgrenze (LoD) des Moduls für somatische Varianten auf dem NextSeq 550Dx-Gerät untersucht. Hierzu wurde ein repräsentativer Assay verwendet, der darauf ausgelegt ist, verschiedene Gene abzufragen, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken. Die Platinum-Genome-Zelllinien GM12878 und GM12877 wurden formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde die DNA extrahiert. GM12878 wurde mit GM12877 so verdünnt, dass die Variantenhäufigkeiten von 74 Varianten (53 SNVs, 7 Insertionen und 14 Deletionen) $0,05 \pm 0,02$ betragen. GM12877 und die verdünnte GM12878-Probe (GM12878-D) wurden über sechs aufeinanderfolgende Starttage hinweg mit einem einzigen Gerät getestet. Dabei wurden zwei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) im Wechsel verwendet und insgesamt sechs Sequenzierungsläufe durchgeführt. Dieser Test ergab 60 Replikate pro Variante in GM12878-D und 72 Replikate pro entsprechender Wildtyp-Koordinate in GM12877 für jede Reagenzien-Charge. Die LoB- und LoD-Werte wurden nach dem im CLSI-Standard EP17-A2 dargelegten klassischen Ansatz unter Verwendung der nichtparametrischen Option berechnet. LoB und LoD wurden für SNVs, Insertionen und Deletionen separat berechnet, indem die Variantenhäufigkeiten für einen gegebenen Variantentyp gepoolt wurden. Der Typ-I-Fehler wurde mit 0,01 und der Typ-II-Fehler mit 0,05 definiert.

Für die LoB wurden die gepoolten Variantenhäufigkeiten aufsteigend sortiert und es wurde die 99. Rangposition für jede Reagenziencharge und für jeden Variantentyp berechnet (Tabelle 5). Das Modul für somatische Varianten verwendet einen Cutoff (die effektive Leerwertgrenze) von 0,026 VAF zur Festlegung der qualitativen Erkennung von Varianten. Die berechneten LoB-Werte weisen nach, dass dieser Cutoff zu einem Typ-I-Fehler von nicht mehr als 0,01 führt.

Tabelle 5 Leerwertgrenze

Variantentyp	Beobachtungen insgesamt	LoB Reagenziencharge 1 (%)	LoB Reagenziencharge 2 (%)
SNV	3.816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Deletion	1.008	1,20	1,20

Zur Berechnung des LoD-Werts wurde für jede Reagenziencharge und für jeden Variantentyp, der unter den Cutoff von 0,026 fällt, der Prozentsatz der individuellen Mutationshäufigkeit berechnet (Tabelle 6). Da die Prozentsätze geringer waren als der Typ-II-Fehler von 5 % (0,05), wurde der Median der kombinierten Variantenhäufigkeiten als LoD berechnet (Tabelle 6). Als LoD für jeden Variantentyp wurde der größere der beiden für die zwei Reagenzienchargen berechneten Werte genommen - 4,97 % für SNVs, 5,12 % für Insertionen und 5,26 % für Deletionen.

Tabelle 6 Nachweisgrenze

Reagenziencharge	Variantentyp	Beobachtungen insgesamt	Anzahl der VAF-Messungen < 2,6 %	Anteil der VAF-Messungen < 2,6 %	Nachweisgrenze (%)
1	SNV	3.180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Deletion	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3.180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Deletion	840	7	0,80	5,26

Genauigkeit

Keimbahn

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Genauigkeit des Varianten-Callings zu untersuchen, die mit dem Modul für Keimbahn-Varianten auf dem NextSeq 550Dx-Gerät bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) erzielt werden kann. Mit einem repräsentativen Assay, der für die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen (150 Amplikons) über 23 verschiedene Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist, wurden 13 eindeutige Platinum-Genome-Proben getestet. Drei Bediener führten auf drei Sequenzierungsgeräten und mit drei Reagenzienchargen an fünf Starttagen insgesamt neun Läufe durch. Die Genauigkeit für SNVs, Insertionen und Deletionen wurde untersucht, indem die Ergebnisse mit einer gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode, Platinum Genomes, Version 2016-1.0, verglichen wurde. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Definition der genomischen Regionen anhand dieser Referenzmethode.

Tabelle 7 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Moduls für Keimbahn-Varianten

Kriterien	Beobachtungen insgesamt ¹	Ergebnis nach Beobachtung ²	Ergebnis nach Lauf ³
PPA für SNV	819	98,7	> 99,9
PPA für Insertionen	819	95,0	98,9
PPA für Deletionen	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	> 99,9	> 99,9

¹Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf (91) multipliziert mit der Anzahl an Läufen (9) = 819.

²Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über alle neun Läufe hinweg.

³Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

Tabelle 8 enthält die Studiendaten mit positiver und negativer prozentualer Übereinstimmung je Probe, wobei die Variantenergebnisse mit Platinum Genomes Version 2016-1.0 für PPA-Berechnungen verglichen werden. Die drei Variantentypen (SNVs, Insertionen und Deletionen) werden kombiniert. Da die Referenzmethode nur Ergebnisse für die Einzelnukleotidvarianten und Insertionen/Deletionen liefert, werden Ergebnisse von Basen ohne Varianten für NPA-Berechnungen mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen.

Tabelle 8 Übereinstimmung des Moduls für Keimbahn-Varianten pro Probe

Probe	Mittlere Call-Rate	Erwartete Varianten ¹	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4.788	4.788	0	0	756.762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8.505	8.379	1	125	751.464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6.048	5.985	5	58	757.701	0	99,9	100	> 99,9

Probe	Mittlere Call-Rate	Erwartete Varianten ¹	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12880	> 99,9	6.993	6.930	0	63	757.638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7.875	7.811	3	61	751.653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6.300	6.174	3	123	754.803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7.119	7.056	0	63	751.905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7.182	7.119	6	57	754.146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7.686	7.560	2	124	754.173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7.245	7.182	7	56	752.469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7.119	7.119	0	0	750.645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6.804	6.804	0	0	756.065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7.434	7.371	1	62	750.015	0	> 99,9	100	> 99,9

¹Gesamtzahl der Varianten in allen Probenreplikaten über neun Läufe hinweg.

Tabelle 9 enthält die Studiendaten je Probe, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode verglichen werden. Die Erkennung wird für jeden Variantentyp - SNVs, Insertionen und Deletionen - separat evaluiert. Referenzpositionen sind ausgeschlossen.

Tabelle 9 Übereinstimmung des Moduls für Keimbahn-Varianten nach Variantentyp

>Probe	SNVs			Insertionen			Deletionen		
	>Erwartet	>TP	>FN	>Erwartet	>TP	>FN	Erwartet	TP	FN
NA12877	2.331	2.331	0	1.323	1.323	0	1.134	1.134	0
NA12878	5.733	5.733	0	1.260	1.197	1	1.512	1.449	0
NA12879	3.591	3.591	0	1.323	1.260	5	1.134	1.134	0
NA12880	4.221	4.221	0	1.512	1.512	0	1.260	1.197	0
NA12881	4.914	4.913	1	1.512	1.449	2	1.449	1.449	0
NA12882	3.717	3.717	0	1.386	1.323	3	1.197	1.134	0
NA12883	4.284	4.284	0	1.449	1.449	0	1.386	1.323	0
NA12884	4.284	4.284	0	1.575	1.512	6	1.323	1.323	0
NA12885	4.725	4.725	0	1.575	1.512	2	1.386	1.323	0
NA12886	4.347	4.347	0	1.449	1.386	7	1.449	1.449	0
NA12887	4.284	4.284	0	1.323	1.323	0	1.512	1.512	0
NA12888	4.158	4.158	0	1.449	1.449	0	1.197	1.197	0
NA12893	4.599	4.599	0	1.386	1.323	1	1.449	1.449	0

Die Proben wurden weiter auf das Calling kleiner Insertionen und Deletionen (Indels) hin analysiert. Eine Gesamtübersicht finden Sie in **Tabelle 10**. Es gab insgesamt 71 Indels mit 1-24 bp großen Insertionen und 1-25 bp großen Deletionen.

Tabelle 10 Zusammenfassung der Indel-Erkennung des Moduls für Keimbahn-Varianten

Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA
Insertion	18.522	18.018	27	477	99,9
Deletion	17.388	17.073	0	315	100

Der repräsentative Assay umfasste 150 Amplikons, die verschiedene genomische Inhalte abdecken sollten. Der GC-Inhalt der Amplikons lag im Bereich von 0,19-0,87. Die Amplikons wiesen auch eine Reihe von Einzelnukleotid- (z. B. PolyA, PolyT), Dinukleotid- und Trinukleotid-Wiederholungen auf. Die Daten wurden pro Amplikon zusammengestellt (Tabelle 11), um die Auswirkungen der genomischen Inhalte auf den Prozentsatz an korrekten Calls zu ermitteln. Der Prozentsatz an korrekten Calls beinhaltet Varianten- und Referenz-Calls und liegt unter 100 %, wenn falsche Calls oder „No Calls“ erfolgt sind.

Tabelle 11 Genauigkeitsdaten auf Amplikon-Level des Moduls für Keimbahn-Varianten

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
1	1	36.450.499	36.450.591	93	93	Indel	0,22	76.167	0	0	100
2	1	109.465.122	109.465.200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), Indel	0,38	64.701	0	0	100
3	1	218.353.867	218.353.957	91	91	Indel	0,4	74.529	0	0	100
4	1	223.906.657	223.906.748	92	92	Indel	0,49	75.348	0	0	100
5	1	228.526.602	228.526.682	81	81	Poly G (5)	0,69	66.339	0	0	100
6	1	236.372.039	236.372.108	70	70	Poly T (10), Indel	0,39	57.330	0	0	100
7	1	247.812.041	247.812.128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), Indel	0,27	72.072	0	0	100
8	2	55.862.774	55.862.863	90	90	Indel	0,28	73.710	0	0	100
9	2	87.003.930	87.004.009	80	80	Indel	0,38	65.520	0	0	100
10	2	177.016.721	177.016.805	85	81	n. z.	0,65	66.339	0	0	100
11	2	186.625.727	186.625.801	75	75	Poly A (8)	0,35	61.425	0	0	100
12	2	190.323.504	190.323.591	88	88	Poly T (5)	0,42	72.072	0	0	100
13	2	200.796.740	200.796.826	87	87	Poly T (5), Indel	0,31	71.253	0	0	100
14	2	212.245.049	212.245.139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), Indel	0,3	74.529	0	0	100
15	2	228.147.052	228.147.144	93	93	Indel	0,43	76.167	0	0	100
16	2	235.016.350	235.016.422	73	73	Poly T (5), Indel	0,42	59.787	0	0	100
17	3	4.466.229	4.466.321	93	93	AT(3), Indel	0,27	74.823	0	1.344	98,2
18	3	46.620.561	46.620.643	83	83	n. z.	0,43	67.977	0	0	100
19	3	49.851.331	49.851.400	70	70	CT(3), Indel	0,49	57.330	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
20	3	189.713.161	189.713.248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72.072	0	0	100
21	3	190.106.030	190.106.104	75	74	Indel	0,57	60.543	0	63	99,9
22	4	2.233.667	2.233.744	78	78	Poly A (6)	0,26	63.882	0	0	100
23	4	7.780.541	7.780.637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79.443	0	0	100
24	4	15.688.604	15.688.681	78	78	n. z.	0,29	63.882	0	0	100
25	4	56.236.521	56.236.586	66	62	Poly A (5), Indel	0,36	50.778	0	0	100
26	4	102.839.244	102.839.314	71	69	Poly A (5)	0,46	56.511	0	0	100
27	4	164.446.743	164.446.804	62	62	Poly A (7), Indel	0,27	50.778	0	0	100
28	5	1.882.081	1.882.158	78	75	n. z.	0,78	61.425	0	0	100
29	5	14.769.061	14.769.144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68.796	0	0	100
30	5	41.069.808	41.069.871	64	64	n. z.	0,39	52.416	0	0	100
31	5	74.077.114	74.077.196	83	83	Poly A (6), Indel	0,3	67.977	0	0	100
32	5	147.475.343	147.475.409	67	67	Poly T (5)	0,37	54.873	0	0	100
33	5	149.323.731	149.323.821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74.529	0	0	100
34	5	155.662.213	155.662.287	75	75	Indel	0,43	61.425	0	0	100
35	6	6.318.713	6.318.814	102	102	Poly G (6)	0,68	83.538	0	0	100
36	6	24.949.983	24.950.074	92	92	Indel	0,63	75.348	0	0	100
37	6	31.084.900	31.084.999	100	94	GCT(5), Indel	0,61	76.608	0	378	99,5
38	6	32.147.987	32.148.084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT (3)	0,55	80.262	0	0	100
39	6	32.986.864	32.986.958	95	95	Indel	0,53	77.805	0	0	100
40	6	33.408.498	33.408.583	86	86	Poly C (6)	0,7	70.434	0	0	100
41	6	41.647.401	41.647.495	95	94	Poly G (5), Indel	0,61	76.986	0	0	100
42	6	112.435.865	112.435.955	91	91	Poly A (5)	0,44	74.529	0	0	100
43	7	22.202.076	22.202.148	73	73	n. z.	0,44	59.787	0	0	100
44	7	66.276.100	66.276.187	88	88	Indel	0,35	72.072	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
45	7	77.365.735	77.365.821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71.253	0	0	100
46	7	110.939.946	110.940.030	85	85	Indel	0,38	69.615	0	0	100
47	7	128.533.468	128.533.557	90	90	Poly G (5), Indel	0,62	73.710	0	0	100
48	7	149.503.875	149.503.965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), Indel	0,71	74.529	0	0	100
49	7	154.404.519	154.404.599	81	66	n. z.	0,31	54.054	0	0	100
50	7	156.476.507	156.476.599	93	93	Indel	0,35	76.167	0	0	100
51	8	1.817.312	1.817.394	83	83	n. z.	0,42	67.977	0	0	100
52	8	24.811.020	24.811.109	90	89	Poly G (7), CTC(4), Indel	0,61	72.171	0	720	99,0
53	8	76.518.625	76.518.691	67	67	Indel	0,3	54.873	0	0	100
54	9	103.054.909	103.055.006	98	98	Poly G (6)	0,67	80.262	0	0	100
55	9	105.586.150	105.586.214	65	65	Indel	0,32	53.235	0	0	100
56	9	107.620.823	107.620.918	96	96	n. z.	0,49	78.624	0	0	100
57	9	123.769.149	123.769.231	83	83	AT(3)	0,37	67.977	0	0	100
58	9	138.995.345	138.995.441	97	97	Poly C (6), Indel	0,68	79.443	0	0	100
59	10	5.987.120	5.987.198	79	78	Poly G (5), Indel	0,47	63.882	0	0	100
60	10	11.784.629	11.784.726	98	91	GC(3)	0,87	74.529	0	0	100
61	10	27.317.777	27.317.855	79	79	Poly T (5)	0,3	64.701	0	0	100
62	10	33.018.351	33.018.440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73.710	0	0	100
63	10	45.084.159	45.084.253	95	95	Indel	0,35	77.805	0	0	100
64	10	55.892.599	55.892.687	89	88	AC(11), Indel	0,42	71.747	0	325	99,5
65	10	101.611.250	101.611.329	80	80	n. z.	0,49	65.520	0	0	100
66	10	118.351.373	118.351.453	81	81	n. z.	0,51	66.339	0	0	100
67	11	8.159.816	8.159.912	97	96	n. z.	0,45	78.624	0	0	100
68	11	30.177.648	30.177.717	70	70	Indel	0,46	57.330	0	0	100
69	11	47.470.345	47.470.444	100	100	n. z.	0,65	81.900	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
70	11	59.837.679	59.837.740	62	62	Indel	0,37	50.778	0	0	100
71	11	64.418.856	64.418.957	102	102	n. z.	0,59	83.538	0	0	100
72	11	93.529.612	93.529.684	73	73	Poly A (5)	0,4	59.787	0	0	100
73	11	101.347.052	101.347.136	85	85	n. z.	0,42	69.615	0	0	100
74	11	102.477.336	102.477.426	91	91	Poly G (6)	0,55	74.529	0	0	100
75	11	118.406.285	118.406.369	85	85	Indel	0,53	69.615	0	0	100
76	11	120.357.801	120.357.885	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	69.615	0	0	100
77	11	125.769.313	125.769.397	85	85	GA(3)	0,52	69.615	0	0	100
78	12	2.834.770	2.834.853	84	84	Poly C (5), Indel	0,52	68.796	0	0	100
79	12	26.811.004	26.811.096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76.167	0	0	100
80	12	30.881.766	30.881.846	81	81	n. z.	0,49	66.339	0	0	100
81	12	88.474.105	88.474.175	71	71	Poly A (6)	0,35	58.149	0	0	100
82	12	120.966.872	120.966.966	95	95	Poly G (5)	0,68	77.805	0	0	100
83	13	24.167.504	24.167.576	73	73	n. z.	0,52	59.787	0	0	100
84	13	25.816.961	25.817.049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), Indel	0,22	72.072	0	0	100
85	13	44.880.112	44.880.200	89	89	Indel	0,49	72.891	0	0	100
86	13	77.665.218	77.665.294	77	77	Indel	0,39	63.063	0	0	100
87	14	31.619.327	31.619.393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54.873	0	0	100
88	14	39.517.884	39.517.966	83	83	n. z.	0,25	67.977	0	0	100
89	14	46.958.962	46.959.034	73	72	Poly T (5), Indel	0,19	58.642	0	326	99,4
90	14	58.050.030	58.050.110	81	81	Indel	0,38	66.339	0	0	100
91	14	82.390.559	82.390.649	91	91	Indel	0,35	74.529	0	0	100
92	14	92.549.544	92.549.609	66	66	Poly A (5)	0,41	54.054	0	0	100
93	14	102.808.496	102.808.589	94	94	Indel	0,62	76.986	0	0	100
94	15	43.170.751	43.170.848	98	96	Poly C (5)	0,45	78.624	0	0	100
95	15	63.446.149	63.446.216	68	68	Indel	0,25	55.692	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
96	15	77.879.807	77.879.901	95	93	Poly G (5), Indel	0,68	76.167	0	0	100
97	15	81.625.334	81.625.428	95	95	Poly T (6)	0,43	77.805	0	0	100
98	15	85.438.263	85.438.334	72	71	Indel	0,65	58.149	0	0	100
99	15	89.817.413	89.817.503	91	91	n. z.	0,36	74.529	0	0	100
100	15	89.864.274	89.864.343	70	70	Indel	0,56	57.330	0	0	100
101	16	1.894.910	1.894.972	63	63	n. z.	0,27	51.597	0	0	100
102	16	28.997.904	28.997.998	95	95	Poly C (5)	0,67	77.805	0	0	100
103	16	53.682.908	53.682.994	87	87	TA(3)	0,41	71.253	0	0	100
104	16	57.954.406	57.954.509	104	104	Poly C (5)	0,67	85.176	0	0	100
105	16	85.706.375	85.706.465	91	91	Poly T (5), Indel	0,37	74.529	0	0	100
106	17	3.563.920	3.564.008	89	89	GC(3)	0,64	72.891	0	0	100
107	17	3.594.191	3.594.277	87	87	Poly C (5), Indel	0,67	71.247	0	6	100
108	17	3.970.090	3.970.180	91	91	Indel	0,46	74.529	0	0	100
109	17	16.084.945	16.085.037	93	93	Indel	0,26	76.167	0	0	100
110	17	33.998.759	33.998.849	91	89	Poly T (5)	0,54	72.891	0	0	100
111	17	39.589.691	39.589.774	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	66.343	27	788	98,8
112	17	41.244.394	41.244.484	91	91	Poly A (5)	0,34	74.529	0	0	100
113	17	45.438.866	45.438.957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	75.348	0	0	100
114	17	61.502.432	61.502.510	79	79	Indel	0,41	64.413	0	288	99,6
115	17	64.023.582	64.023.667	86	86	Poly T (7)	0,22	70.434	0	0	100
116	17	72.308.237	72.308.320	84	84	GAG(3)	0,62	68.796	0	0	100
117	18	2.616.456	2.616.522	67	67	GA(3)	0,31	54.873	0	0	100
118	18	6.980.478	6.980.568	91	91	n. z.	0,37	74.529	0	0	100
119	18	9.888.026	9.888.094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56.511	0	0	100
120	18	38.836.999	38.837.073	75	75	Poly A (5), Indel	0,37	61.425	0	0	100
121	18	47.405.382	47.405.462	81	81	CTC(3), Indel	0,47	66.339	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
122	18	54.815.665	54.815.749	85	85	CT(3), Indel	0,45	69.615	0	0	100
123	18	59.773.996	59.774.060	65	65	n. z.	0,48	53.235	0	0	100
124	19	625.143	625.241	99	99	n. z.	0,59	81.081	0	0	100
125	19	18.121.418	18.121.491	74	74	n. z.	0,68	60.605	1	0	100
126	19	18.186.574	18.186.643	70	70	n. z.	0,64	57.330	0	0	100
127	20	746.056	746.149	94	94	n. z.	0,61	76.986	0	0	100
128	20	10.633.195	10.633.276	82	82	AC(3)	0,59	67.158	0	0	100
129	20	17.705.633	17.705.708	76	76	CT(3)	0,58	62.244	0	0	100
130	20	21.766.821	21.766.890	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	57.330	0	0	100
131	20	25.278.421	25.278.521	101	101	Indel	0,63	82.719	0	0	100
132	20	50.897.302	50.897.368	67	67	Indel	0,36	54.873	0	0	100
133	20	62.331.904	62.331.994	91	88	Poly G (6)	0,73	72.072	0	0	100
134	20	62.690.860	62.690.946	87	87	Indel	0,57	71.253	0	0	100
135	21	30.300.823	30.300.888	66	66	Indel	0,35	54.054	0	0	100
136	21	33.694.176	33.694.273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80.262	0	0	100
137	21	36.710.706	36.710.792	87	87	GT(3), Indel	0,39	71.253	0	0	100
138	21	46.644.924	46.644.992	69	69	Poly A (6), AG(3), Indel	0,32	56.439	0	72	99,9
139	21	46.705.575	46.705.664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73.710	0	0	100
140	22	25.750.774	25.750.873	100	100	Indel	0,63	81.900	0	0	100
141	22	32.439.233	32.439.329	97	97	n. z.	0,68	79.443	0	0	100
142	22	37.409.844	37.409.940	97	97	Indel	0,46	79.443	0	0	100
143	22	37.637.596	37.637.694	99	99	n. z.	0,6	81.081	0	0	100
144	22	47.081.347	47.081.438	92	92	Indel	0,66	75.348	0	0	100
145	X	15.870.424	15.870.492	69	69	Poly T (5)	0,26	56.511	0	0	100
146	X	135.288.543	135.288.611	69	69	Poly C (5)	0,62	56.511	0	0	100
147	X	135.290.777	135.290.847	71	71	n. z.	0,52	58.149	0	0	100
148	Y	2.655.397	2.655.461	65	0	n. z.	0,55	0	0	0	n. z.

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
149	Y	2.655.519	2.655.609	91	0	n. z.	0,48	0	0	0	n. z.
150	Y	2.655.609	2.655.679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	n. z.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe NA12878 wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) festgelegt wurde. Von den 150 Amplikons befanden sich 92 Amplikons vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 41 Amplikons wiesen eine Teilüberlappung und 17 Amplikons keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 10.000 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse sind in [Tabelle 12](#) dargestellt.

Tabelle 12 Übereinstimmung der Ergebnisse des Keimbahn-Varianten-Moduls mit der NIST-Datenbank für Probe NA12878

Probe	Anzahl Amplikons	Mittlere Call-Rate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6.552	1	610.470	0	> 99,9	100	> 99,9

Die Daten aus den neun Läufen der Studie mit dem Modul für Keimbahn-Varianten belegen, dass das NextSeq 550Dx-Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- ▶ GC-Inhalt $\geq 19\%$ (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit 19 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,6 %)
- ▶ GC-Inhalt $\leq 87\%$ (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit 87 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- ▶ PolyA-Längen ≤ 9 (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer PolyA-Wiederholung von neun Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- ▶ PolyT-Längen ≤ 10 (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer PolyT-Wiederholung von 10 Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- ▶ PolyG-Längen ≤ 7 (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer PolyG-Wiederholung von sieben Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 1,0 %)
- ▶ PolyC-Längen ≤ 6 (alle Base-Calls in 2.457 sequenzierten Amplikons mit einer PolyC-Wiederholung von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- ▶ Längen von Dinukleotid-Wiederholungen ≤ 11 -fach (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer 11-fachen Dinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- ▶ Längen von Trinukleotid-Wiederholungen ≤ 5 -fach (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer 5-fachen Trinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- ▶ Insertionslängen ≤ 24 (66.343 von 66.370 Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer Insertion aus 24 Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 1,2 %; in der Region mit der Insertion aus 24 Nukleotiden traten keine falschen Calls auf)
- ▶ Deletionslängen ≤ 25 (alle Base-Calls in 2.457 sequenzierten Amplikons mit einer Deletion von 25 Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)

Somatisch

Die hier beschriebene Studie wurde genutzt, um die Genauigkeit des Varianten-Callings zu untersuchen, die mit dem Modul für somatische Varianten auf dem NextSeq 550Dx-Gerät bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) erzielt werden kann.

Diese Studie verwendete einen repräsentativen Assay, der dafür ausgelegt ist, verschiedene Gene abzufragen, die 12.588 Basen (150 Amplikons) über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken. Aus FFPE-behandelten Blöcken wurde Platinium-Genome-DNA extrahiert, um sechs eindeutige Proben zu erzeugen, die in der Studie evaluiert werden sollten.

DNA der Probe GM12877 wurde mit DNA der Probe GM12878 zu GM12877-D5 und GM12877-D7 verdünnt, um eine Reihe von eindeutig heterozygoten Varianten mit Variantenhäufigkeiten von ca. 5 % bzw. 7 % zu erzeugen. Auf ähnliche Weise wurde DNA der Probe GM12878 mit DNA der Probe GM12877 verdünnt, um GM12878-D5 und GM12878-D7 zu erzeugen. Jede der Proben wurde dreifach getestet, mit Ausnahme der verdünnten Proben, die mit sechsfacher Wiederholung getestet wurden. Drei Bediener führten auf drei Sequenzierungsgeräten und mit drei Reagenzienchargen an fünf Starttagen insgesamt neun Läufe durch. Die Genauigkeit für SNV, Insertionen und

Deletionen wurde untersucht, indem die Ergebnisse mit einer gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode, Platinum Genomes Version 2016-1.0, verglichen wurden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Definition der genomischen Regionen anhand dieser Referenzmethode.

Tabelle 13 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Moduls für somatische Varianten

Kriterien	Beobachtungen insgesamt ¹	Ergebnis nach Beobachtung ²	Ergebnis nach Lauf ³
PPA für SNV	378	98,9	99,9
PPA für Insertionen	378	96,9	99,9
PPA für Deletionen	378	97,1	99,9
NPA	378	> 99,9	> 99,9
OPA	378	> 99,9	> 99,9

¹Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf (42) multipliziert mit der Anzahl an Läufen (9) = 378.

²Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über alle neun Läufe hinweg.

³Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

Tabelle 14 enthält die Studiendaten mit positiver und negativer prozentualer Übereinstimmung je Probe, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode für PPA-Berechnungen verglichen werden. Die drei Variantentypen (SNVs, Insertionen und Deletionen) werden kombiniert. Da die Referenzmethode nur Ergebnisse für die Einzelnukleotidvarianten und Insertionen/Deletionen liefert, werden Ergebnisse von Basen ohne Varianten für NPA-Berechnungen mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen.

Tabelle 14 Übereinstimmung des Moduls für somatische Varianten pro Probe

Probe	Mittlere Call-Rate	Erwartet	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2.052	2.025	0	27	318.682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3.645	3.564	0	81	317.645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2.592	2.538	0	54	323.614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3.078	3.024	0	54	322.038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3.294	3.213	0	81	322.121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2.916	2.889	0	27	323.048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9.288	8.930	0	358	630.621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9.288	9.032	0	256	629.719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9.288	8.699	42	547	628.582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9.288	9.108	0	180	629.803	0	100	100	100

Tabelle 15 enthält die Studiendaten je Probe, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode verglichen werden. Die Erkennung wird für jeden Variantentyp - SNVs, Insertionen und Deletionen - separat evaluiert. Referenzpositionen sind ausgeschlossen.

Tabelle 15 Übereinstimmung des Moduls für somatische Varianten nach Variantentyp

Probe	SNVs			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2.457	2.457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1.539	1.539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1.836	1.836	0	675	648	0	567	540	0

Probe	SNVs			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
GM12885	2.025	2.025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1.782	1.782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5.454	5.392	0	1.782	1.647	0	2.052	1.891	0
GM12877-D7	5.454	5.406	0	1.782	1.728	0	2.052	1.898	0
GM12878-D5	5.454	5.192	28	1.782	1.651	9	2.052	1.856	5
GM12878-D7	5.454	5.445	0	1.782	1.719	0	2.052	1.944	0

Die 10 Proben wurden weiter auf das Calling kleiner Insertionen und Deletionen (Indels) hin analysiert (Tabelle 16). Es gab insgesamt 71 Indels mit 1-24 bp großen Insertionen und 1-25 bp großen Deletionen.

Tabelle 16 Zusammenfassung der Indel-Erkennung des Moduls für somatische Varianten

Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA
Insertion	10.773	10.282	9	482	99,2
Deletion	11.502	10.667	5	830	> 99,9

Die 150 Amplikons waren so konzipiert, dass sie zahlreiche genomische Inhalte abdeckten. Der GC-Inhalt der Amplikons lag im Bereich von 0,19-0,87 %. Die Amplikons wiesen auch eine Reihe von Einzelnukleotid- (z. B. PolyA, PolyT), Dinukleotid- und Trinukleotid-Replikaten auf. Die Daten wurden pro Amplikon zusammengestellt (Tabelle 17), um die Auswirkungen der genomischen Inhalte auf den Prozentsatz an korrekten Calls zu ermitteln. Der Prozentsatz an korrekten Calls beinhaltet Varianten- und Referenz-Calls und liegt unter 100 %, wenn falsche Calls oder „No Calls“ erfolgt sind.

Tabelle 17 Genauigkeitsdaten auf Amplikon-Level des Moduls für somatische Varianten

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
1	1	36.450.499	36.450.591	93	93	Indel	0,22	35.066	0	88	99,7
2	1	109.465.122	109.465.200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), Indel	0,38	29.827	0	35	99,9
3	1	218.353.867	218.353.957	91	91	Indel	0,4	34.202	0	283	99,2
4	1	223.906.657	223.906.748	92	92	Indel	0,49	34.613	0	163	99,5
5	1	228.526.602	228.526.682	81	81	Poly G (5)	0,69	30.571	0	47	99,8
6	1	236.372.039	236.372.108	70	70	Poly T (10), Indel	0,39	26.452	0	8	100,0
7	1	247.812.041	247.812.128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), Indel	0,27	33.148	0	116	99,7
8	2	55.862.774	55.862.863	90	90	Indel	0,28	33.928	0	92	99,7
9	2	87.003.930	87.004.009	80	80	Indel	0,38	30.218	0	22	99,9
10	2	177.016.721	177.016.805	85	81	n. z.	0,65	30.616	0	2	>99,9
11	2	186.625.727	186.625.801	75	75	Poly A (8)	0,35	28.017	0	499	98,3
12	2	190.323.504	190.323.591	88	88	Poly T (5)	0,42	33.207	0	57	99,8
13	2	200.796.740	200.796.826	87	87	Poly T (5), Indel	0,31	32.524	9	718	97,8
14	2	212.245.049	212.245.139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), Indel	0,3	33.972	0	456	98,7
15	2	228.147.052	228.147.144	93	93	n. z.	0,43	35.051	0	103	99,7
16	2	235.016.350	235.016.422	73	73	Poly T (5), Indel	0,42	27.459	0	136	99,5
17	3	4.466.229	4.466.321	93	93	AT(3), Indel	0,27	34.534	0	620	98,2
18	3	46.620.561	46.620.643	83	83	n. z.	0,43	31.339	0	44	99,9
19	3	49.851.331	49.851.400	70	70	CT(3), Indel	0,49	26.373	0	87	99,7

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
20	3	189.713.161	189.713.248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32.829	0	857	97,5
21	3	190.106.030	190.106.104	75	74	Indel	0,57	27.925	0	47	99,8
22	4	2.233.667	2.233.744	78	78	Poly A (6)	0,26	29.327	4	162	99,4
23	4	7.780.541	7.780.637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36.585	0	117	99,7
24	4	15.688.604	15.688.681	78	78	n. z.	0,29	29.427	0	57	99,8
25	4	56.236.521	56.236.586	66	62	Poly A (5), Indel	0,36	23.356	5	75	99,7
26	4	102.839.244	102.839.314	71	69	Poly A (5)	0,46	25.942	0	140	99,5
27	4	164.446.743	164.446.804	62	62	Poly A (7), Indel	0,27	22.944	0	560	97,6
28	5	1.882.081	1.882.158	78	75	n. z.	0,78	28.299	0	53	99,8
29	5	14.769.061	14.769.144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31.658	0	94	99,7
30	5	41.069.808	41.069.871	64	64	n. z.	0,39	24.120	0	72	99,7
31	5	74.077.114	74.077.196	83	83	Poly A (6), Indel	0,3	31.297	0	77	99,8
32	5	147.475.343	147.475.409	67	67	Poly T (5)	0,37	25.277	0	55	99,8
33	5	149.323.731	149.323.821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34.308	0	90	99,7
34	5	155.662.213	155.662.287	75	75	Indel	0,43	28.266	0	163	99,4
35	6	6.318.713	6.318.814	102	102	Poly G (6)	0,68	38.489	0	67	99,8
36	6	24.949.983	24.950.074	92	92	Indel	0,63	34.730	0	46	99,9
37	6	31.084.900	31.084.999	100	94	GCT(5), Indel	0,61	35.057	0	483	98,6
38	6	32.147.987	32.148.084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36.647	0	406	98,9
39	6	32.986.864	32.986.958	95	95	Indel	0,53	35.681	0	238	99,3
40	6	33.408.498	33.408.583	86	86	Poly C (6)	0,7	32.438	0	70	99,8
41	6	41.647.401	41.647.495	95	94	Poly G (5), Indel	0,61	35.441	0	91	99,7
42	6	112.435.865	112.435.955	91	91	Poly A (5)	0,44	34.354	0	44	99,9
43	7	22.202.076	22.202.148	73	73	n. z.	0,44	27.575	0	28	99,9
44	7	66.276.100	66.276.187	88	88	Indel	0,35	33.060	0	213	99,4

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
45	7	77.365.735	77.365.821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32.423	0	489	98,5
46	7	110.939.946	110.940.030	85	85	Indel	0,38	32.074	0	56	99,8
47	7	128.533.468	128.533.557	90	90	Poly G (5), Indel	0,62	33.791	0	281	99,2
48	7	149.503.875	149.503.965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), Indel	0,71	34.316	0	82	99,8
49	7	154.404.519	154.404.599	81	66	n. z.	0,31	24.901	0	47	99,8
50	7	156.476.507	156.476.599	93	93	Indel	0,35	35.067	0	87	99,8
51	8	1.817.312	1.817.394	83	83	n. z.	0,42	31.365	0	9	> 99,9
52	8	24.811.020	24.811.109	90	89	Poly G (7), CTC(4), Indel	0,61	32.781	0	890	97,4
53	8	76.518.625	76.518.691	67	67	Indel	0,3	25.228	0	146	99,4
54	9	103.054.909	103.055.006	98	98	Poly G (6)	0,67	36.968	0	76	99,8
55	9	105.586.150	105.586.214	65	65	Indel	0,32	24.472	0	100	99,6
56	9	107.620.823	107.620.918	96	96	n. z.	0,49	36.203	0	85	99,8
57	9	123.769.149	123.769.231	83	83	AT(3)	0,37	31.329	0	45	99,9
58	9	138.995.345	138.995.441	97	97	Poly C (6), Indel	0,68	36.472	0	201	99,5
59	10	5.987.120	5.987.198	79	78	Poly G (5), Indel	0,47	29.473	0	11	> 99,9
60	10	11.784.629	11.784.726	98	91	GC(3)	0,87	34.188	0	213	99,4
61	10	27.317.777	27.317.855	79	79	Poly T (5)	0,3	29.843	0	19	99,9
62	10	33.018.351	33.018.440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33.968	0	68	99,8
63	10	45.084.159	45.084.253	95	95	Indel	0,35	35.829	0	81	99,8
64	10	55.892.599	55.892.687	89	88	AC(11), Indel	0,42	32.098	88	2.048	93,8
65	10	101.611.250	101.611.329	80	80	n. z.	0,49	30.217	0	28	99,9
66	10	118.351.373	118.351.453	81	81	n. z.	0,51	30.531	0	96	99,7
67	11	8.159.816	8.159.912	97	96	n. z.	0,45	36.105	0	192	99,5
68	11	30.177.648	30.177.717	70	70	Indel	0,46	26.318	0	153	99,4
69	11	47.470.345	47.470.444	100	100	n. z.	0,65	37.785	0	24	99,9

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
70	11	59.837.679	59.837.740	62	62	Indel	0,37	23.368	0	68	99,7
71	11	64.418.856	64.418.957	102	102	n. z.	0,59	38.546	0	10	> 99,9
72	11	93.529.612	93.529.684	73	73	Poly A (5)	0,4	27.516	0	78	99,7
73	11	101.347.052	101.347.136	85	85	n. z.	0,42	32.083	0	48	99,9
74	11	102.477.336	102.477.426	91	91	Poly G (6)	0,55	34.047	0	369	98,9
75	11	118.406.285	118.406.369	85	85	Indel	0,53	32.065	0	74	99,8
76	11	120.357.801	120.357.885	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	32.083	0	47	99,9
77	11	125.769.313	125.769.397	85	85	GA(3)	0,52	32.103	0	27	99,9
78	12	2.834.770	2.834.853	84	84	Poly C (5), Indel	0,52	31.645	16	525	98,3
79	12	26.811.004	26.811.096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34.824	0	330	99,1
80	12	30.881.766	30.881.846	81	81	n. z.	0,49	30.497	0	121	99,6
81	12	88.474.105	88.474.175	71	71	Poly A (6)	0,35	26.773	0	65	99,8
82	12	120.966.872	120.966.966	95	95	Poly G (5)	0,68	35.830	9	72	99,8
83	13	24.167.504	24.167.576	73	73	n. z.	0,52	27.498	0	114	99,6
84	13	25.816.961	25.817.049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), Indel	0,22	32.824	0	566	98,3
85	13	44.880.112	44.880.200	89	89	Indel	0,49	33.574	0	77	99,8
86	13	77.665.218	77.665.294	77	77	Indel	0,39	29.075	0	31	99,9
87	14	31.619.327	31.619.393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25.313	0	13	99,9
88	14	39.517.884	39.517.966	83	83	n. z.	0,25	31.360	0	22	99,9
89	14	46.958.962	46.959.034	73	72	Poly T (5), Indel	0,19	26.499	0	717	97,4
90	14	58.050.030	58.050.110	81	81	Indel	0,38	30.494	0	133	99,6
91	14	82.390.559	82.390.649	91	91	Indel	0,35	34.313	0	86	99,7
92	14	92.549.544	92.549.609	66	66	Poly A (5)	0,41	24.555	0	1.527	94,1
93	14	102.808.496	102.808.589	94	94	Indel	0,62	35.472	0	69	99,8
94	15	43.170.751	43.170.848	98	96	Poly C (5)	0,45	36.264	0	24	99,9
95	15	63.446.149	63.446.216	68	68	Indel	0,25	25.667	0	37	99,9

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
96	15	77.879.807	77.879.901	95	93	Poly G (5), Indel	0,68	34.745	0	432	98,8
97	15	81.625.334	81.625.428	95	95	Poly T (6)	0,43	35.870	0	40	99,9
98	15	85.438.263	85.438.334	72	71	Indel	0,65	26.762	0	76	99,7
99	15	89.817.413	89.817.503	91	91	n. z.	0,36	34.286	0	112	99,7
100	15	89.864.274	89.864.343	70	70	Indel	0,56	26.449	0	11	> 99,9
101	16	1.894.910	1.894.972	63	63	n. z.	0,27	23.809	0	5	> 99,9
102	16	28.997.904	28.997.998	95	95	Poly C (5)	0,67	35.860	0	50	99,9
103	16	53.682.908	53.682.994	87	87	TA(3)	0,41	32.835	0	60	99,8
104	16	57.954.406	57.954.509	104	104	Poly C (5)	0,67	39.177	0	144	99,6
105	16	85.706.375	85.706.465	91	91	Poly T (5), Indel	0,37	34.075	0	323	99,1
106	17	3.563.920	3.564.008	89	89	GC(3)	0,64	33.632	0	11	> 99,9
107	17	3.594.191	3.594.277	87	87	Poly C (5), Indel	0,67	32.752	0	134	99,6
108	17	3.970.090	3.970.180	91	91	Indel	0,46	34.343	0	82	99,8
109	17	16.084.945	16.085.037	93	93	Indel	0,26	35.077	0	78	99,8
110	17	33.998.759	33.998.849	91	89	Poly T (5)	0,54	33.553	0	89	99,7
111	17	39.589.691	39.589.774	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	30.554	53	2.296	92,9
112	17	41.244.394	41.244.484	91	91	Poly A (5)	0,34	34.360	0	38	99,9
113	17	45.438.866	45.438.957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	34.367	0	418	98,8
114	17	61.502.432	61.502.510	79	79	Indel	0,41	29.751	0	119	99,6
115	17	64.023.582	64.023.667	86	86	Poly T (7)	0,22	32.176	0	340	99,0
116	17	72.308.237	72.308.320	84	84	GAG(3)	0,62	31.604	7	141	99,5
117	18	2.616.456	2.616.522	67	67	GA(3)	0,31	25.273	8	45	99,8
118	18	6.980.478	6.980.568	91	91	n. z.	0,37	34.386	0	12	> 99,9
119	18	9.888.026	9.888.094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25.692	0	399	98,5
120	18	38.836.999	38.837.073	75	75	Poly A (5), Indel	0,37	27.923	0	893	96,9
121	18	47.405.382	47.405.462	81	81	CTC(3), Indel	0,47	30.598	0	20	99,9

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
122	18	54.815.665	54.815.749	85	85	CT(3), Indel	0,45	31.969	0	161	99,5
123	18	59.773.996	59.774.060	65	65	n. z.	0,48	24.531	0	48	99,8
124	19	625.143	625.241	99	99	n. z.	0,59	37.298	0	124	99,7
125	19	18.121.418	18.121.491	74	74	n. z.	0,68	27.881	0	109	99,6
126	19	18.186.574	18.186.643	70	70	n. z.	0,64	26.442	0	26	99,9
127	20	746.056	746.149	94	94	n. z.	0,61	35.501	0	31	99,9
128	20	10.633.195	10.633.276	82	82	AC(3)	0,59	30.951	0	72	99,8
129	20	17.705.633	17.705.708	76	76	CT(3)	0,58	28.686	0	42	99,9
130	20	21.766.821	21.766.890	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	26.372	0	88	99,7
131	20	25.278.421	25.278.521	101	101	Indel	0,63	38.159	0	20	99,9
132	20	50.897.302	50.897.368	67	67	Indel	0,36	25.188	0	544	97,9
133	20	62.331.904	62.331.994	91	88	Poly G (6)	0,73	32.969	0	309	99,1
134	20	62.690.860	62.690.946	87	87	Indel	0,57	32.818	0	77	99,8
135	21	30.300.823	30.300.888	66	66	Indel	0,35	24.758	9	181	99,2
136	21	33.694.176	33.694.273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36.902	0	160	99,6
137	21	36.710.706	36.710.792	87	87	GT(3), Indel	0,39	32.841	0	48	99,9
138	21	46.644.924	46.644.992	69	69	Poly A (6), AG(3), Indel	0,32	25.939	0	280	98,9
139	21	46.705.575	46.705.664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33.942	0	78	99,8
140	22	25.750.774	25.750.873	100	100	Indel	0,63	37.733	0	86	99,8
141	22	32.439.233	32.439.329	97	97	n. z.	0,68	36.617	0	49	99,9
142	22	37.409.844	37.409.940	97	97	Indel	0,46	36.525	0	162	99,6
143	22	37.637.596	37.637.694	99	99	n. z.	0,6	37.398	0	24	99,9
144	22	47.081.347	47.081.438	92	92	Indel	0,66	34.754	0	22	99,9
145	X	15.870.424	15.870.492	69	69	Poly T (5)	0,26	26.046	0	36	99,9
146	X	135.288.543	135.288.611	69	69	Poly C (5)	0,62	26.019	0	63	99,8
147	X	135.290.777	135.290.847	71	71	n. z.	0,52	26.780	0	58	99,8
148	Y	2.655.397	2.655.461	65	0	n. z.	0,55	0	0	0	n. z.

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Inhalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
149	Y	2.655.519	2.655.609	91	0	n. z.	0,48	0	0	0	n. z.
150	Y	2.655.609	2.655.679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	n. z.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe GM12878 wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) festgelegt wurde. Von den 150 Amplikons befanden sich 92 Amplikons vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 41 Amplikons wiesen eine Teilüberlappung und 17 Amplikons keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 10.000 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse sind in [Tabelle 18](#) dargestellt.

Tabelle 18 Übereinstimmung der Ergebnisse des Moduls für somatische Varianten mit der NIST-Datenbank für Probe GM12878

Probe	Anzahl Amplikons	Mittlere Call-Rate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2.808	0	258.488	0	100	100	100

Die Daten aus den neun Läufen der Studie mit dem Modul für somatische Varianten belegen, dass das NextSeq 550Dx-Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- ▶ GC-Inhalt $\geq 19\%$ (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit 19 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 2,6 %)
- ▶ GC-Inhalt $\leq 87\%$ (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit 87 % GC-Inhalt erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,6 %)
- ▶ PolyA-Längen ≤ 9 (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einer PolyA-Wiederholung von neun Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 2,5 %)
- ▶ PolyT-Längen ≤ 10 (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einer PolyT-Wiederholung von 10 Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von unter 0,1 %)
- ▶ PolyG-Längen ≤ 6 (alle Base-Calls in 2.268 sequenzierten Amplikons mit einer PolyG-Wiederholung von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- ▶ PolyC-Längen ≤ 6 (alle Base-Calls in 756 sequenzierten Amplikons mit einer PolyC-Wiederholung von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,4%)
- ▶ Längen von Dinukleotid-Wiederholungen ≤ 4 -fach (alle Base-Calls in 1.890 sequenzierten Amplikons mit einer 4-fachen Dinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,9 %)
- ▶ Längen von Trinukleotid-Wiederholungen ≤ 5 -fach (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einer 5-fachen Trinukleotid-Wiederholung erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 1,4 %)
- ▶ Insertionslängen ≤ 23 (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einer Insertion von 23 Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,8 %)
- ▶ Deletionslängen ≤ 25 (alle Base-Calls in 1.134 sequenzierten Amplikons mit einer Deletion von 25 Nukleotiden erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,7 %)

Präzision

Zur Ermittlung der Präzision des NextSeq 550Dx-Geräts führten drei Bediener auf drei Geräten und mit drei Reagenzienchargen über fünf Starttage hinweg neun Sequenzierungsläufe mit 13 eindeutigen Platinum-Genome-Proben durch. Der repräsentative Assay, die Proben und die Referenzmethode waren die gleichen wie bei der Genauigkeitsstudie für das Modul für Keimbahn-Varianten. Die Präzisionsbeiträge wurden durch Analyse der Varianzkomponenten bestimmt. Hierbei wurde VAF als Reaktionsvariable verwendet, die Berechnung der Standardabweichungen erfolgte auf Komponentenebene nach Gerät, Reagenziencharge, Bediener und Starttag ([Tabelle 19](#)). Bei der Analyse der Variabilität der einzelnen Geräte, Bediener oder Reagenzienchargen wurden insgesamt 699 SNVs, 176 Insertionen und 235 Deletionen untersucht.

Tabelle 19 Präzisionsergebnisse für das NextSeq 550Dx-Gerät (Standardabweichung)

Komponente	Variantentyp	Standardabweichung der Komponente		Standardabweichung insgesamt	
		Max.	Median	Max.	Median
Charge	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deletion	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Gerät	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertion	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deletion	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Bediener	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertion	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deletion	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Tag	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertion	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deletion	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Methodenvergleich (Sequenzierungsplattform)

Vollblut- und FFPE-Proben wurden auf dem NextSeq 550Dx- und dem MiSeqDx-Gerät mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und dem Workflow für Keimbahn- bzw. somatische Varianten untersucht. Die Übereinstimmung der Variantenhäufigkeit bei Blut- und FFPE-Proben wurde mit mehreren repräsentativen Assays beurteilt. In [Abbildung 2](#) ist die VAF-Korrelation zwischen den beiden Geräten für einen repräsentativen Assay dargestellt. [Tabelle 20](#) enthält eine Zusammenfassung dieser Korrelation nach Assay-Panel. Basierend auf der starken Korrelation zwischen dem MiSeqDx- und dem NextSeq 550Dx-Gerät wurde festgelegt, dass die Leistungsmerkmale bezüglich voranalytischer Faktoren (z. B. Extraktionsmethoden oder störende Substanzen) für beide Geräte gelten. Weitere Informationen finden Sie in der Packungsbeilage zum TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Abbildung 2 VAF-Korrelation zwischen dem MiSeqDx- und dem NextSeq 550Dx-Gerät für FFPE- (links) und Blutproben (rechts) bei Assay 1

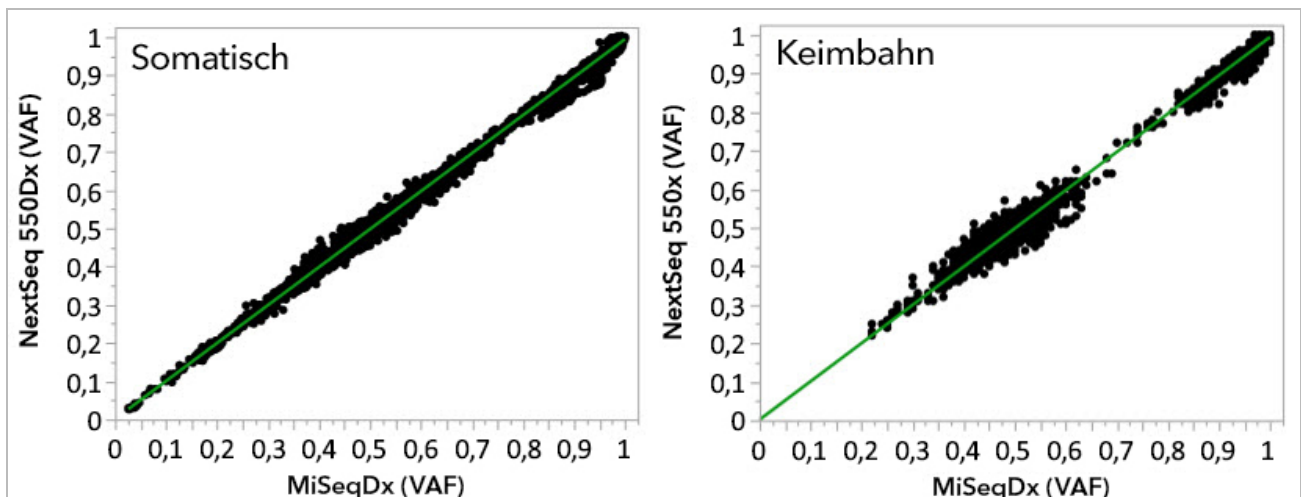


Tabelle 20 Ergebnisse des Methodenvergleichs mit eindeutigen Blut- und FFPE-Proben

gDNA-Quelle	Assay (Oligo-Panel)	Biologische Replikate (Proben)	Technische Replikate (pro Probe)	Beobachtungen (Anzahl der Varianten)	Steigungswert	Regressionskonstante	Korrelation (R ²)
Blut	Assay 1	45	2	8.369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Blut	Assay 2	45	2	5.457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Assay 1	46	2	8.319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	Assay 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Zwei Datenpunkte wurden aufgrund der für das Modul für Keimbahn-Varianten angegebenen Limitierungen entfernt.

²Bestimmungskoeffizient für die VAF-Chargen gemäß Abbildung 2.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des NextSeq 550Dx-Geräts wurde mit Platinum-Genome-Proben und einem repräsentativen Assay untersucht, der darauf ausgelegt ist, unter der Nutzung von 150 Amplikons verschiedene Gene abzufragen, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken. Der Test für das Keimbahn-Varianten-Modul bestand aus sieben Replikaten von 13 Proben. Der Test für das Modul für somatische Varianten bestand aus sechs Replikaten von sieben Proben auf verschiedenen VAF-Ebenen. Die Proben wurden mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx vorbereitet.

Die Tests wurden an drei externen Standorten mit einer Charge des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) durchgeführt. An jedem Standort wurde ein NextSeq 550Dx-Gerät verwendet. Zwei Bediener führten die Tests an jedem Standort durch. Jeder Bediener führte die Tests an drei nicht aufeinanderfolgenden Starttagen für jeden Probentyp bei insgesamt 36 Läufen über die drei Standorte hinweg durch, davon jeweils 18 Läufe für den Keimbahn- und für den somatischen Workflow.

Keimbahn

Keimbahn-Varianten mit einem VAF-Wert von $\geq 0,2$ werden als positiv (Variante) gemeldet. Für erwartete positive Keimbahn-Varianten wurden die Daten innerhalb jedes Variantentyps (SNV, Insertion, Deletion) auf die No-Call-Rate und die Rate der korrekten positiven Calls hin ausgewertet. **Tabelle 21** führt die beobachteten Raten für jeden Variantentyp auf, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 21 Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp

Variantentyp	No Call (Kein Call)			Korrekt positiver Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Insertionen	1.026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Deletionen	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

Keimbahn-Varianten mit einem VAF-Wert von $< 0,2$ werden als negativ (Wildtyp) gemeldet. Für erwartete negative Keimbahnpositionen wurden die Daten auf „No Calls“ und korrekte Wildtyp-Call-Raten hin ausgewertet. **Tabelle 22** führt die beobachteten Raten auf, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 22 Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Call (Kein Call)			Korrekt negativer Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
Wildtyp	4.883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

Bei Keimbahn-Varianten mit einem VAF-Wert $\geq 0,2$ und $< 0,7$ erfolgen positiv heterozygote Calls für die Variante. Bei Varianten mit einem VAF-Wert $\geq 0,7$ erfolgen positiv homozygote Calls für die Variante. Es wurden Keimbahn-Proben mit heterozygoten Varianten verwendet, um zu ermitteln, ob die inhärente Variabilität des Assays den Genotypaufruf beeinflusst. Der Cx-Wert wurde für beide Cutoffs (0,2 für heterozygote und 0,7 für homozygote Genotypen) bestimmt, wobei x für den Anteil der wiederholten Tests steht, die den Cutoff überschreiten. Für den unteren Cutoff von 0,2 VAF war $C_x \geq 99,999\%$. Dies weist darauf hin, dass bei 99,999 % oder mehr der heterozygoten Varianten heterozygote Calls erfolgen. Bezogen auf den oberen Cutoff von 0,7 VAF war $C_x \leq 0,001\%$. Dies weist darauf hin, dass bei 0,001 % oder weniger der heterozygoten Varianten homozygote Calls erfolgen. **Tabelle 23** fasst die Ergebnisse nach Variantentyp zusammen.

Tabelle 23 Keimbahn-Cx-Werte für heterozygote Varianten

Variantentyp	Cutoff bei 0,2 VAF	Cutoff bei 0,7 VAF
	$\geq C$ 99,999 %	$\leq C$ 0,001 %
SNV	94/94	94/94
Insertionen	24/24	24/24
Deletionen	35/35	35/35
Summe	153	153

Somatisch

Somatische Varianten mit einem VAF-Wert von $\geq 0,026$ werden als positiv (Variante) gemeldet. Beobachtungen mit VAF-Werten $\geq 0,01$ und $< 0,026$ wurden für die Zwecke dieser Analyse als mehrdeutig angesehen (weder positiv noch negativ, als niedrige Variantenhäufigkeit markiert). Zur Beurteilung der Leistung wurden die Ergebnisse auf drei Arten berechnet:

- ▶ Bester Fall: Jedes mehrdeutige Ergebnis wurde als korrekter positiver Call gewertet (Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen).
- ▶ Schlechtester Fall: Jedes mehrdeutige Ergebnis wurde als falscher Call betrachtet (Nichtübereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen).
- ▶ Ausschlussfall: Jedes mehrdeutige Ergebnis wurde von der Analyse ausgeschlossen.

In den drei Tabellen, **Tabelle 24**, **Tabelle 25** und **Tabelle 26**, sind die Call-Ergebnisse für den besten, schlechtesten und den Ausschlussfall sowie die nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenzen (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 % zusammengefasst.

Tabelle 24 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp (bester Fall)

Variantentyp	Korrekt positiver Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertionen	18.036	18.036	100	99,98	100,00
Deletionen	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabelle 25 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp (schlechtester Fall)

Variantentyp	Korrekt positiver Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertionen	18.000	18.036	99,8	99,72	99,86
Deletionen	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Tabelle 26 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp (mehrdeutige Calls entfernt)

Variantentyp	Korrekt positiver Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54.346	54.346	100	99,99	100,00
Insertionen	18.000	18.000	100	99,98	100,00
Deletionen	18.381	18.381	100	99,98	100,00

Somatische Varianten mit einem VAF-Wert von $< 0,01$ werden als negative Calls (Wildtyp) gemeldet. Für erwartete negative somatische Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und korrekte Wildtyp-Call-Raten hin ausgewertet. Korrekte Wildtyp-Calls wurden ermittelt, indem die „No Calls“ ausgeschlossen und die beobachteten Calls, die in den mehrdeutigen Bereich (VAF-Werte $\geq 0,01$ und $< 0,026$) fielen, sowie die falschen Calls, die über dem Cutoff (VAF-Werte $\geq 0,026$) lagen, von der Gesamtsumme subtrahiert wurden. [Tabelle 27](#) führt die beobachteten Gesamt- und prozentualen Ergebnisse für negative somatische Positionen für die No-Call-Rate und die Call-Rate korrekter Wildtypen auf, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 27 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Call (Kein Call)			Korrekt positiver Call						
	Beobachtet	Summe	Prozent	Mehrdeutig	Falsch	Richtig	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
Wildtyp	36.326	8.909.676	0,408	2.254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

Zur Bestimmung des C95 des Assays (innerhalb jedes Variantentyps) wurden somatische Proben mit unterschiedlichen VAF-Werten für dieselbe Variante ausgewertet. Um die Variabilität nahe dem Cutoff des Assays zu bewerten, wurden Proben verwendet, die erwartete VAF-Werte zwischen 0,02 und 0,07 hatten. Für jede Variante wurde C95 bestimmt. In [Tabelle 28](#) sind die höchsten C95-Werte für jeden Variantentyp aufgeführt.

Tabelle 28 C95 für somatische Varianten – Übersicht

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

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) – Leistung

Überblick

Das NextSeq 550Dx-Gerät wird von zwei Reagenzien-Kits unterstützt: dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen). Um zu zeigen, dass das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) überprüften und validierten Anforderungen an die Analyseleistung erfüllen kann, wurden Studien mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) durchgeführt. Es wurden zwei Bibliotheksvorbereitungen mithilfe des TruSeq Custom Amplicon Kit Dx durchgeführt, eine für den Keimbahn-Workflow und die andere für den somatischen Workflow. Bibliotheken aus jedem Workflow wurden mit drei Chargen aus dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) mithilfe von drei NextSeq 550Dx-Geräten getestet. Darüber hinaus umfassten die Tests für jeden Workflow einen einzelnen Lauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen).

Analytische Sensitivität (Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) und Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD))

Die Überprüfung mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) zeigte, dass das NextSeq 550Dx-Gerät Varianten mit einer VAF von 0,05 mit einem Typ-II-Fehler von $\leq 0,05$ erkennen konnte und dass der vom Modul für somatische Varianten verwendete Cutoff von 0,026 VAF (die effektive Leerwertgrenze) einen Typ-I-Fehler von $\leq 0,01$ unterstützt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird erwartet, dass eine Variante mit einer VAF von 0,05 in 95 % aller Fälle größer als eine VAF von 0,026 ist oder dieser entspricht und dass eine Wildtyp-Position in 99 % aller Fälle unter einem VAF-Wert von 0,026 liegt. Um sicherzustellen, dass diese Ergebnisse mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erreicht werden, wurden mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) wiederholte Messungen auf dem NextSeq 550Dx-Gerät mit Wildtyp-Proben (LoB-Proben) sowie mit Proben durchgeführt, die Varianten mit einer VAF von 0,05 (LoD-Proben) enthielten. Die Anteile an Calls über und unter dem Cutoff von 0,026 wurden dann mit den mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) erzielten Ergebnissen verglichen.

Die Tests umfassten zwei LoD-Proben mit jeweils einem Satz an eindeutigen Varianten, bei denen eine VAF von 0,05 anvisiert wurde, sowie entsprechenden LoB-Proben, die in Bezug auf die zu untersuchenden Varianten Wildtyp-Proben waren. Zur Bibliotheksvorbereitung wurden LoD- und LoB-Proben mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx in jeweils acht und sieben Replikaten verarbeitet. Die Bibliotheken wurden ursprünglich mithilfe des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert, um Varianten/genomische Koordinaten für die LoB/LoD-Überprüfung mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) zu bestimmen. Bei der LoD-Analyse (N = 51 Varianten) wurden alle Varianten mit einem durchschnittlichen VAF-Wert zwischen 0,045 und 0,055 (LoD-Varianten) basierend auf den Ergebnissen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) verwendet. Bei der LoB-Analyse wurden die 51 entsprechenden genomischen Koordinaten bewertet.

Zur Überprüfung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) wurden Bibliotheken in drei Läufen an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Verwendung desselben Geräts und derselben Charge des Reagenzien-Kits sequenziert. Diese Tests ergaben 24 Replikate für jede der 51 LoD-Varianten und 21 Replikate für jede der entsprechenden Wildtyp-Positionen. Der Anteil an Wildtyp-Calls mit einer VAF von $< 0,026$ ist in [Tabelle 29](#) aufgeführt. Der Anteil an LoD-Varianten-Calls mit einer VAF von $\geq 0,026$ ist in [Tabelle 30](#) angegeben.

Tabelle 29 Anteil an Calls $< 0,026$ für Wildtyp-Positionen (Überprüfung der LoB-Werte)

Varianteart	Überprüfte Positionen	Beobachtungen insgesamt	Anzahl der VAF-Messungen $\geq 2,6$ %	Anteil $< 2,6$ %	Anteil 95 % Konfidenzintervall
SNV	32	672	0	1	0,994-1
Insertion	11	231	0	1	0,984-1
Deletion	8	168	0	1	0,978-1

Tabelle 30 Anteil an Calls $\geq 0,026$ VAF für LoD-Varianten (Überprüfung der LoD-Werte)

Varianteart	Überprüfte Positionen	Beobachtungen insgesamt	Anzahl der VAF-Messungen $< 2,6$ %	Anzahl der VAF-Messungen $\geq 2,6$ %	Anteil $\geq 2,6$ %	Anteil 95 % Konfidenzintervall
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993-1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967-0,996
Deletion	8	192	2	190	0,99	0,963-0,997

Genauigkeit

Keimbahn

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Genauigkeit des Varianten-Calls zu untersuchen, die mit dem Modul für Keimbahn-Varianten bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erzielt

werden kann. Mit einem repräsentativen Assay wurden 12 eindeutige Platinum-Genome-Proben getestet. Insgesamt wurden auf drei NextSeq 550Dx-Geräten und mit drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) 11 Läufe durchgeführt.

Die Genauigkeit für SNVs, Insertionen und Deletionen wurde untersucht, indem die Ergebnisse mit einer gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode, Platinum Genomes, Version 2016-1.0, verglichen wurden. Die Genauigkeitsergebnisse aus einem einzelnen Sequenzierungslauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) werden als Referenz bereitgestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse finden Sie in [Tabelle 31](#).

Tabelle 31 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Moduls für Keimbahn-Varianten

Kriterien	Beobachtungen insgesamt (v2.5) ¹	Ergebnis nach Beobachtung (v2.5) ²	Ergebnis nach Beobachtung (v2) ³	Ergebnis nach Lauf (v2.5) ⁴	Ergebnis nach Lauf (v2) ⁴
PPA für SNV	1.056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9
PPA für Insertionen	1.056	100	100	100	98,9
PPA für Deletionen	1.056	95,2	95,2	> 99,9	100
NPA	1.056	100	100	100	100
OPA	1.056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

¹Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf multipliziert mit der Anzahl an Läufen (96 Proben pro Lauf x 11 Läufe = 1056 Beobachtungen).

²Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über alle Läufe hinweg (basierend auf 11 Läufen für NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über 1 Lauf hinweg (96 Beobachtungen insgesamt).

⁴Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

Somatisch

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Genauigkeit des Varianten-Callings zu untersuchen, die mit dem Modul für somatische Varianten auf dem NextSeq 550Dx-Gerät bei Verwendung des NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erzielt werden kann. Mit einem repräsentativen Assay wurden 10 Platinum-Genome-FFPE-Proben (zwei mit Varianten, die auf bis zu 0,05 VAF verdünnt wurden) getestet. Insgesamt wurden auf drei NextSeq 550Dx-Geräten und mit drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) 11 Läufe durchgeführt.

Die Genauigkeit für SNVs, Insertionen und Deletionen wurde untersucht, indem die Ergebnisse mit einer gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode, Platinum Genomes, Version 2016-1.0, verglichen wurden. Die Genauigkeitsergebnisse aus einem einzelnen Sequenzierungslauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2(300 Zyklen) werden als Referenz bereitgestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse finden Sie in [Tabelle 32](#).

Tabelle 32 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Moduls für somatische Varianten

Kriterien	Beobachtungen insgesamt (v2.5) ¹	Ergebnis nach Beobachtung (v2.5) ²	Ergebnis nach Beobachtung (v2) ³	Ergebnis nach Lauf (v2.5) ⁴	Ergebnis nach Lauf (v2) ⁴
PPA für SNV	528	100	100	100	100
PPA für Insertionen	528	96,9	96,9	> 99,9	> 99,9
PPA für Deletionen	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

¹Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf multipliziert mit der Anzahl an Läufen (48 Proben pro Lauf x 11 Läufe = 528 Beobachtungen).

²Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über alle Läufe hinweg (basierend auf 11 Läufen für NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5).

³Niedrigster beobachteter Wert bei Probenreplikation über 1 Lauf hinweg (96 Beobachtungen insgesamt).

⁴Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

Präzision

Keimbahn

Die Präzision des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) mit dem Modul für Keimbahn-Varianten wurde mithilfe von Platinum-Genome-Proben und einem repräsentativen Assay untersucht. Die Tests umfassten eine einzelne Bibliotheksvorbereitung mithilfe des TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und beinhalteten 12 Proben, die mit je acht Replikaten verarbeitet wurden. Die Sequenzierung von Bibliotheken erfolgte mithilfe von drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) und drei NextSeq 550Dx-Geräten und es wurden insgesamt neun Sequenzierungsläufe durchgeführt.

Es wurden Proben mit heterozygoten Varianten verwendet, um zu ermitteln, ob die inhärente Variabilität des Assays den Genotypaufruf beeinflusst (N = 153 eindeutig heterozygote Varianten). Der Cx-Wert wurde für beide Cutoffs des Moduls für Keimbahn-Varianten (0,2 für heterozygote und 0,7 für homozygote Genotypen) bestimmt, wobei x für den Anteil der wiederholten Tests steht, die den Cutoff überschreiten. Für den unteren Cutoff von 0,2 VAF lag die Variante mit dem Cx-Mindestwert für das NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bei > 99,9 %. Dies weist darauf hin, dass bei mehr als 99,9 % der heterozygoten Varianten heterozygote Calls erfolgen. Für den oberen Cutoff von 0,7 VAF lag die Variante mit dem Cx-Höchstwert für das NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bei < 1,5 %. Dies weist darauf hin, dass bei 1,5% oder weniger der heterozygoten Varianten homozygote Calls erfolgen. [Tabelle 33](#) fasst die Ergebnisse nach Variantentyp zusammen. Die Cx-Werte aus einem einzelnen Sequenzierungslauf mithilfe des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) werden als Referenz bereitgestellt.

Tabelle 33 Keimbahn-Cx-Werte für heterozygote Varianten

Variantentyp	N	Cutoff bei 0,2 VAF		Cutoff bei 0,7 VAF	
		Min. Cx (v2.5) ¹	Min. Cx (v2) ²	Max. Cx (v2.5) ¹	Max. Cx (v2) ²
SNV	94	> 99,9%	> 99,9%	1,5 %	1,0 %
Insertionen	24	100 %	100 %	0 %	< 0,1%
Deletionen	35	100 %	> 99,9%	< 0,1%	< 0,1%

¹Cx-Werte basierend auf Gesamtschätzungen der Standardabweichung aus der Analyse der Varianzkomponenten.

²Cx-Werte basierend auf Standardabweichungen der Probe.

Somatisch

Die Präzision des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) mit dem Modul für somatische Varianten wurde mithilfe von Platinum-Genome-FFPE-Proben und einem repräsentativen Assay untersucht. Die Tests umfassten eine einzelne Bibliotheksvorbereitung mithilfe des TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und beinhalteten zwei Proben mit je 8 Replikaten. Die Sequenzierung von Bibliotheken erfolgte mithilfe des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) und drei NextSeq 550Dx-Geräten und es wurden insgesamt neun Sequenzierungsläufe durchgeführt.

Zur Überprüfung der Variabilität nahe dem VAF-Cutoff des Moduls für somatische Varianten (bei somatischen Varianten mit einem VAF-Wert von $\geq 0,026$ erfolgen positive Calls für die Variante) wurden somatische Varianten mit einem erwarteten VAF-Wert von $\leq 0,10$ (N = 131 eindeutige Varianten) verwendet. Für jede der somatischen Varianten wurden C95-Werte bestimmt. C95-Werte stellen die VAF dar, bei der die Wahrscheinlichkeit, dass sie größer als der VAF-Cutoff des Moduls für somatische Varianten ist, bei 95 % liegt. Die höchsten C95-Werte nach Variantentyp sind in [Tabelle 34](#) aufgeführt. Die C95-Ergebnisse aus einem einzelnen Sequenzierungslauf mithilfe des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) werden als Referenz bereitgestellt.

Tabelle 34 C95 für somatische Varianten – Übersicht

Varianteyp	Anzahl der untersuchten Varianten	C95 (v2.5) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Insertionen	24	0,062	0,061
Deletionen	33	0,060	0,060

¹C95-Werte basierend auf Gesamtschätzungen der Standardabweichung aus der Analyse der Varianzkomponenten.

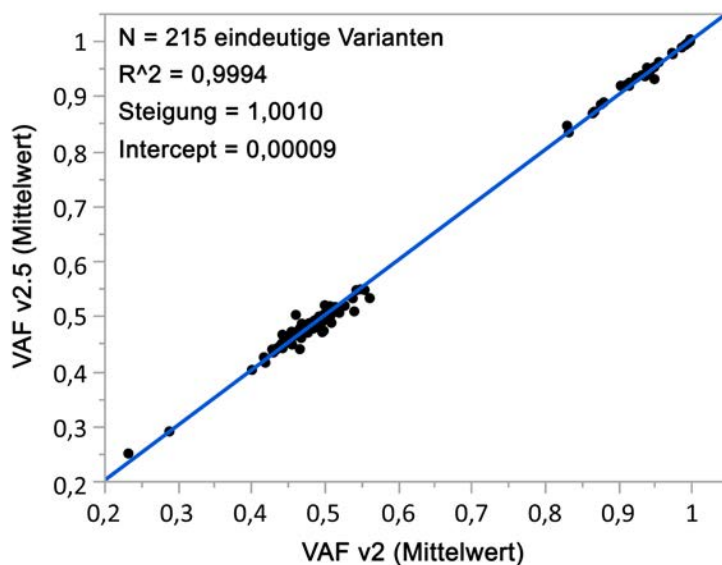
²C95-Werte basierend auf Standardabweichungen der Probe.

Methodenvergleich (Reagenzien-Kit)

Keimbahn

Die durchschnittlichen VAF-Werte von 215 eindeutigen Varianten wurden über das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) hinweg anhand der vom Modul für Keimbahn-Varianten generierten Ergebnisse ausgewertet. Die VAF-Durchschnittswerte wurden aus 11 Sequenzierungsläufen (v2.5) und einem Sequenzierungslauf (v2) berechnet. Bei der Berechnung des Durchschnittswerts der einzelnen Varianten wurden mindestens acht Replikate verwendet. In [Abbildung 3](#) ist die VAF-Korrelation zwischen den beiden Reagenzien-Kits dargestellt. Aufgrund der starken linearen VAF-Korrelation und der Ähnlichkeit der Ergebnisse zwischen den Reagenzien-Kits wurde festgelegt, dass die ursprünglich mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) in Kombination mit dem Modul für Keimbahn-Varianten überprüften und validierten Leistungsmerkmale auch für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) gelten.

Abbildung 3 VAF-Korrelation (Variant Allele Frequency) des Moduls für Keimbahn-Varianten zwischen dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen).

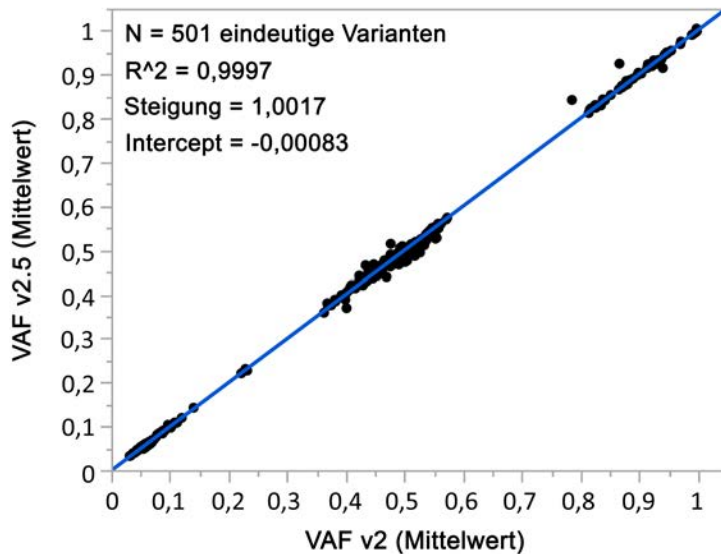


Somatisch

Die durchschnittlichen VAF-Werte für 501 eindeutige Varianten wurden über das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) hinweg anhand der vom Modul für somatische Varianten generierten Ergebnisse ausgewertet. Die VAF-Durchschnittswerte wurden aus 11 Sequenzierungsläufen (v2.5) und einem Sequenzierungslauf (v2) berechnet. Bei der Berechnung des Durchschnittswerts der einzelnen eindeutigen Varianten wurden mindestens drei Replikate verwendet. In [Abbildung 4](#)

ist die VAF-Korrelation zwischen den beiden Reagenzien-Kits dargestellt. Aufgrund der VAF-Korrelation und der Ähnlichkeit der Ergebnisse zwischen den Reagenzien-Kits wurde festgelegt, dass die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) in Kombination mit dem Modul für somatische Varianten überprüften und validierten Leistungsmerkmale auch für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) gelten.

Abbildung 4 VAF-Korrelation (Variant Allele Frequency) des Moduls für somatische Varianten zwischen dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen).



Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN, WAS ZU EINEM ERLÖSCHEN DER PRODUKTGARANTIE FÜHRT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformationen



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australische Niederlassung

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

Produktkennzeichnungen

Informationen zu den Symbolen, die auf der Produktverpackung und -kennzeichnung verwendet werden, finden Sie unter „support.illumina.com“ im Symbolschlüssel auf der Registerkarte *Documentation and Literature* (Dokumentation und Literatur) für Ihr Kit.