

# NextSeq™ 550Dx-instrument

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

ENDAST FÖR EXPORT

Katalognr 20005715

## Avsedd användning

NextSeq 550Dx-instrumentet är avsett för sekvensering av DNA-bibliotek vid *in vitro*-diagnostiska tester. NextSeq 550Dx-instrumentet ska användas med specifika registrerade, certifierade eller godkända *in vitro*-diagnostiska reagenser och analysprogramvara.

## Grundläggande principer

Illumina NextSeq 550Dx-instrumentet är avsett för sekvensering av DNA-bibliotek i *in vitro*-diagnostiska tester. Som indata använder NextSeq 550Dx bibliotek som genererats från DNA där provindex och infångade sekvenser läggs till amplifierade mål. Provbibliotek fångas upp i en flödescell och sekvenseras av instrumentet med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes). I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att detektera fluorescensmärkta enkelnukleotidbaser medan de införlivas i växande DNA-strängar. Programvaran för realtidsanalys (RTA) utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar varje bas för varje sekvenseringscykel en kvalitetspoäng. När den primära analysen är klar kan den sekundära analysen genomföras i instrumentet för att utföra basbestämning. NextSeq 550Dx använder olika moduler för sekundär analys beroende på arbetsflöde. För modulerna Germline Variant (Könszellvariant) eller Somatic Variant (Somatisk variant) omfattar behandlingen demultiplexning, FASTQ-filgenerering, inpassning, variantbestämning och generering av filer i variantbestämningsformat (VCF och gVCF). VCF- och gVCF-filerna innehåller information om varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom.

## Dubbel startkonfiguration

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

## Begränsningar

- 1 För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- 2 Modulerna Germline Variant (Könszellvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant) kan när de används med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) eller NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) leverera:
  - ▶ Utdata från sekvensering  $\geq 90$  gigabaser (Gb).
  - ▶ Läsningens längd (i paired end-körning) 2 x 150 baspar (bp).
  - ▶ Baser större än eller lika med Q30  $\geq 75$  % vid läsningenslängder på 2 x 150 bp. 75 % eller fler av baserna har Phred-kvalitetspoäng  $\geq 30$ , vilket indikerar att basbestämningens noggrannhet överstiger 99,9 %.

- 3 Läsningar med indels (insertioner, deletioner eller kombinationer) vars innehållslängd > 25 bp inte passas in av analysprogrammet. Det innebär att indels med en längd på > 25 bp inte detekteras av analysprogrammet.
- 4 Analysprogrammet passar kanske inte in ampliconläsningar med extremt variantinnehåll, vilket leder till att regionen rapporteras som vildtyp. Exempel på sådant extremt innehåll är:
  - ▶ läsningar som innehåller fler än tre indels
  - ▶ läsningar med en längd på minst 30 bp med ett SNV-innehåll (enkelnukleotidvariant) på > 4 % av den totala ampliconmålslängden (exklusive sondområden)
  - ▶ läsningar med en längd på < 30 bp med ett SNV-innehåll på > 10 % av den totala ampliconlängden (inklusive sondområden).
- 5 Större varianter, såsom multinukleotidvarianter (MNV:er) och större indels, kan komma att rapporteras som separata mindre varianter i VCF-utdatafilen.
- 6 Deletionsvarianter kan filtreras eller missas när de sträcker sig över två överlappande ampliconer om deletionens längd är större än eller lika med överlappningen mellan ampliconerna.
- 7 Systemet kan inte detektera indels om de angränsar direkt till en primer och det inte finns någon överlappande amplicon. För regioner med överlappande ampliconer kan analysen inte detektera deletioner när regionen med överlappningen är mindre än den deletion som ska detekteras. Om exempelvis det överlappande området mellan två intilliggande ampliconer är två baser kan analysen inte kan detektera några deletioner som inkluderar båda de två baserna. En enbas-deletion vid endera av baserna kan detekteras.
- 8 Liksom med alla hybridiseringsbaserade arbetsflöden för beredning av bibliotek kan underliggande polymorfismer, mutationer, insertioner eller deletioner i oligonukleotid-bindande regioner påverka de alleler som undersöks och de bestämningar som görs under sekvensering. Till exempel:
  - ▶ En variant i fas med en variant i primerregionen amplificeras eventuellt inte, vilket ger ett falskt negativt resultat.
  - ▶ Varianter i primerregionen kan förhindra amplifiering av referensallelen, vilket medför en felaktig homozygot variantbestämning.
  - ▶ Indelvarianter i primerregionen kan orsaka en falsk positiv bestämning i slutet av läsningen bredvid primern.
- 9 Indels kan filtreras på grund av strängbias om de finns nära slutet på en läsning och mjukklippas under inpassning.
- 10 Små MNV:er har inte validerats och rapporteras enbart i modulen Somatic Variant (Somatisk variant).
- 11 Deletioner rapporteras i VCF vid koordinaten för föregående bas enligt VCF-formatet. Därför bör du beakta intilliggande varianter innan du rapporterar att en enskild basbestämning är en homozygot referens.
- 12 Begränsningarna nedan gäller specifikt för Germline:
  - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet, tillsammans med Local Run Manager-modulen Germline Variant (Könsellsvariant) för NextSeq 550Dx, är utformat för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av könsellsvarianter (t.ex. homozygot, heterozygot eller vildtyp).
  - ▶ Vid användning med modulen Germline Variant (Könsellsvariant) krävs en minsta täckning per amplicon på 150x för korrekt variantbestämning. Därmed krävs 150 stödjande DNA-fragment, vilket motsvarar 300 överlappande paired-end-läsningar. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
  - ▶ Variation i kopietal (CNV) kan påverka huruvida en variant identifieras som homozygot eller heterozygot.
  - ▶ Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. Vid bestämning av könsellsvarianter krävs minst nio upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras. Endast upprepningar med en längd på upp till 5 bp beaktas (R5x9).
  - ▶ En indel och en SNV i ett och samma lokus kan leda till endast en variant som rapporteras.
- 13 Begränsningarna nedan gäller specifikt för Somatic.
  - ▶ NextSeq 550Dx-instrumentet, tillsammans med Local Run Manager-modulen Somatic Variant (Somatisk variant) för NextSeq 550Dx, är utformat för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av somatiska varianter (t.ex. bestämning av en somatisk variant med en variantfrekvens som är större än eller lika med

0,026 med en detektionsgräns på 0,05).

- ▶ Vid användning med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) krävs en minsta täckning per amplikon på 450x per oligonukleotidpool för korrekt variantbestämning. Därmed krävs 450 stödjande DNA-fragment per oligonukleotidpool, vilket motsvarar 900 överlappande paired-end-läsningar. Antalet prover och det totala antalet målbaserna påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
- ▶ För bestämning av somatiska varianter krävs minst sex upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras, och endast upprepningar med en längd på upp till 3 bp beaktas (R3x6).
- ▶ Modulen Somatic Variant (Somatisk variant) kan inte skilja mellan könscellvarianter och somatiska varianter. Modulen är utformad för att detektera varianter med ett antal olika variantfrekvenser, men variantfrekvens kan inte användas för att skilja mellan somatiska varianter och könscellvarianter.
- ▶ Normal vävnad i provet påverkar detektionen av varianter. Den rapporterade detektionsgränsen baseras på en variantfrekvens som är relativ till det totala DNA som extraheras från både tumörvävnad och normal vävnad.

## Produktkomponenter

- 1 NextSeq 550Dx-instrument (katalognr 20005715)
- 2 Programvarukomponenter för NextSeq 550Dx-instrumentet, bland annat följande:

Programvara	Funktion	Beskrivning
NextSeq 550Dx systemprogramvara (NOS)	Styr drift av instrumentet.	Programvaran NOS styr instrumentets drift under sekvensering och genererar bilder som används av programvaran för realtidsanalys (RTA).
Programvaran för realtidsanalys (RTA)	Utför primär analys.	Programvaran RTA konverterar bilderna som genereras av NOS för varje platta per cykel av sekvenseringskörningen till basbestämningsfiler, som utgör indata för analysmodulerna i Local Run Manager. Programvaran RTA innehåller inget användargränssnitt.
Local Run Manager (lokal körningshanterare)	Gränssnitt för val av modul.	Programvaran Local Run Manager (lokal körningshanterare) är en integrerad lösning i instrumentet för användarhantering, val av lämplig analysmodul och övervakning av status.
Modulen Somatic Variant (Somatisk variant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Lokal Run Manager (lokal körningshanterare), genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexning, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Piscis) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom, inklusive uppmätt variantfrekvens.
Modulen Germline Variant (Könscellsvariant)	Utför sekundär analys.	Programvaran för analysmoduler, Lokal Run Manager (lokal körningshanterare), genomför basbestämning genom sekundär analys. Bearbetningen innefattar demultiplexning, generering av FASTQ-filer, inpassning, variantbestämning och rapportering. Variantbestämningsprogrammet (Piscis) genererar VCF-filer som innehåller information om de varianter som finns på särskilda positioner i ett referensgenom och identifierar varje variant som heterozygot eller homozygot.

## Driftförhållanden

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

## Utrustning och material

### Nödvändig utrustning och material som säljs separat

NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler), katalognr 20019554

NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler), katalognr 20028871

### Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

#### Förbrukningsmaterial för sekvenseringskörning som tillhandahålls av användaren

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
Sprittorkar, 70 % isopropyl eller 70 % etanol	VWR, artikelnummer 95041-714 (eller likvärdig) Valfri leverantör av laboratorieutrustning	Rengöring av flödescell samt allmänna ändamål
Laborietrasa, luddfri	VWR, artikelnummer 21905-026 (eller likvärdig)	Rengöring av flödescell samt allmänna ändamål

#### Förbrukningsmaterial för instrumentunderhåll som tillhandahålls av användaren

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
NaOCl, 5 % (natriumhypoklorit)	Sigma-Aldrich, artikelnummer 239305 (eller likvärdig produkt av laboratorie kvalitet)	Rengöring av instrumentet med hjälp av manuell rengöring efter en körning, spädd till 0,12 %.
Tween 20	Sigma-Aldrich, artikelnummer P7949	Rengöring av instrumentet med hjälp av alternativ för manuell rengöring, spädd till 0,05 %.
Vatten av laboratorie kvalitet	Valfri leverantör av laboratorieutrustning	Rengöring av instrumentet (manuell rengöring).
Lufffilter	Illumina, artikelnummer 20022240	Rengöring av luften som instrumentet tar in för kylning.

#### Riktlinjer för vatten av laboratorie kvalitet

Använd alltid vatten av laboratorie kvalitet eller avjoniserat vatten för att utföra instrumentprocedurer. Använd aldrig kranvatten. Använd endast vatten av följande kvaliteter eller likvärdiga:

- ▶ avjoniserat vatten
- ▶ Illumina PW1
- ▶ vatten med en resistivitet på 18 megaohm (MΩ)
- ▶ Milli-Q-vatten
- ▶ Super-Q-vatten
- ▶ vatten av molekylärbiologisk kvalitet.

## Varningar och försiktighetsåtgärder



### VARNING

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

- 1 **Vissa komponenter i reagenser som tillhandahålls av Illumina för användning med NextSeq 550Dx-instrumentet innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser.** Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet (SDS) på [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- 2 Hantera alla blodprover som om de vore känt smittsamma med humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
- 3 Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämrad provkvaliteten.
- 4 Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenser i kit. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenser i kit.
- 5 God labororiesed och laboreriehygien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontamination kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
- 6 För att undvika kontamination ska områdena som används före och efter amplifiering ha egen utrustning och eget förbrukningsmaterial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, värmeblock, vortexblandare och centrifuger).
- 7 Index för parade prover måste matcha den tryckta plattlayouten exakt. Local Run Manager (lokal körningshanterare) fyller automatiskt de indexprimrar som förknippas med provnamnen när de anges i modulen. Användaren rekommenderas att verifiera indexprimrarna associerade med proverna innan sekvenseringskörningen påbörjas. Bristande överensstämmelse mellan prov och plattlayout leder till förlust av positiv providentifikation och felaktig rapportering av resultat.
- 8 Installation av antivirusprogram som tillhandahålls av användaren rekommenderas starkt för att skydda datorn mot virus. Se användarhandboken för anvisningar om installation.
- 9 Använd inte NextSeq 550Dx om någon av panelerna är borttagna. Om instrumentet används när en eller flera paneler är borttagna finns det risk för potentiell exponering för systemspänning och likspänning.
- 10 Rör inte vid flödescellssteget i flödescellsfacket. Värmaren i det här facket håller mellan 22 °C och 95 °C och kan orsaka brännskador.
- 11 Instrumentet väger cirka 84 kg och kan orsaka allvarliga personskador om det tappas eller hanteras fel.

## Bruksanvisning

Följande bruksanvisning är avsedd för körning av modulerna Germline Variant (Könscellsvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant) i diagnostiskt läge på NextSeq 550Dx-instrumentet med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) eller NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).

## Ange körningsinformation

Detaljerade anvisningar finns i Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 100000009513) och i den aktuella guiden för modulen Local Run Manager (lokal körningshanterare).

### Ställa in parametrar

- 1 Logga in i Local Run Manager (lokal körningshanterare).
- 2 Välj **Create Run** (Skapa körning) och sedan **Somatic Variant** (Somatisk variant) eller **Germline Variant** (Könscellsvariant).

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

#### Importerera manifestfiler för körningen

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



#### OBS!


Lägg till manifesten via funktionen Module Settings (Modulinställningar) för att göra manifestfilerna tillgängliga för alla körningar med analysmodulen Germline Variant (Könsceallsvariant) eller Somatic Variant (Somatisk variant). Den här funktionen kräver behörighet på administratörsnivå. Mer information finns i *Referensguide för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

#### Ange prover för körningen

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


- ▶ **Enter samples manually** (Ange prover manuellt) - Använd den tomma tabellen på skärmen Create Run (Skapa körning).
- ▶ **Import samples** (Importerera prover) - navigera till en extern fil i ett format med kommateckenavgränsade fält (\*.csv). En mall kan hämtas på skärmen Create Run (Skapa körning).

#### Ange prover manuellt

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

## 8 Välj **Save Run** (Spara körning).

### Importerera prover

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

## Förbereda reagenskassetten

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

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

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



### OBS!

Om mer än en kassett tinas upp i samma vattenbad ska tiden för upptining förlängas.

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

## Förbereda flödescellen

- 1 Ta fram en ny flödescellförpackning från förvaringen vid  $2\text{ °C}$  till  $8\text{ °C}$ .
- 2 Ta bort folieförpackningen och lägg lådan åt sidan i rumstemperatur i 30 minuter.

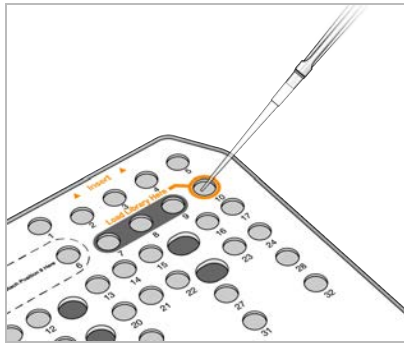
## Förbereda bibliotek för sekvensering

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

## Ladda bibliotek på reagenskassetten

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

Bild 1 Ladda bibliotek



## Ställa in en sekvenseringskörning

- 1 Logga in i NextSeq 550Dx med ditt lösenord till programvaran Local Run Manager (lokal körningshanterare).
- 2 Välj **Sequence** (Sekvens) på startskärmen i programvaran NOS.
- 3 Välj en körning ur listan och välj sedan **Next** (Nästa).  
En serie skärmar för inställning av en sekvenseringskörning öppnas i följande ordning: Load Flow Cell (Ladda flödescell), Load Buffer Cartridge (Ladda buffertkasset), Load Reagent Cartridge (Ladda reagenskasset) och Pre-run Check (Kontroll före körning).
- 4 När skärmen Load Flow Cell (Ladda flödescell) visas gör du rent och laddar sedan flödescellen.
  - ▶ Ta ut flödescellen ur folieförpackningen.
  - ▶ Öppna den genomskinliga blisterförpackningen i plast och ta ut flödescellen.
  - ▶ Rengör flödescellens glasyta med en luddfri sprittork. Torka glasytan torr med en luddfri laboratorietrasa.
  - ▶ Säkerställ att flödescellens glasyta är ren. Upprepa rengöringssteget vid behov.
  - ▶ Ta ut den använda flödescellen från en tidigare körning.
  - ▶ Passa in flödescellen över inpassningsstiften och placera flödescellen på steget.
- 5 Välj **Load** (Ladda).  
Luckan stängs automatiskt, flödescellens ID visas på skärmen och sensorerna kontrolleras.
- 6 Följ programvarans uppmaningar för att tömma behållaren med förbrukade reagenser, ladda NextSeq 550Dx-buffertkassetten och ladda NextSeq 550Dx-reagenskassetten.  
När NextSeq 550Dx-buffertkassetten och -reagenskassetten har laddats läser och registrerar programvaran RFID. Buffert- och reagenskassetternas respektive ID visas på skärmen och sensorerna kontrolleras.
- 7 Välj **Start** (Starta) när den automatiska kontrollen före körning är klar. (Krävs inte om automatisk start konfigurerats.)
- 8 Skärmen Sequencing (Sekvensering) öppnas när körningen påbörjas. Skärmen ger en visuell framställning av den pågående körningen, inklusive intensiteter och kvalitetspoäng (Q-scores).

## Resultat

Programvaran för realtidsanalys (RTA) är en integrerad programvara som utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar varje bas för varje sekvenseringscykel en kvalitetspoäng. När den primära analysen avslutats startar modulen Local Run Manager (lokal körningshanterare) på NextSeq 550Dx-instrumentet automatiskt den sekundära analysen. De sekundära analysprocesser som beskrivs här gäller för modulerna Germline Variant (Könscellsvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant).

## Demultiplexning

Vid demultiplexning jämförs varje indexläsningssekvens med de indexsekvenser som angetts för körningen. Inga kvalitetsvärden beaktas i det här steget.

Indexläsningar identifieras med följande steg:



- ▶ Prover numreras i den ordning de anges för körningen, med början på 1.
- ▶ Provnummer 0 är reserverat för kluster som inte tilldelats till något prov.
- ▶ Klustren tilldelas till ett prov när indexsekvensen matchar exakt eller när det finns högst en enskild felparning per indexläsning.

## Generering av FASTQ-filer

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

Varje FASTQ-fil innehåller endast läsningar för ett prov och namnet på det provet ingår i FASTQ-filens namn. I modulerna Germline Variant (Könscecellsvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant) genereras åtta FASTQ-filer per prov per oligopool, fyra från läsning 1 och fyra från läsning 2. Detta leder till totalt 8 och 16 FASTQ-filer per prov för Germline respektive Somatic. FASTQ-filer är inpassningens primära indata.

## Inpassning

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

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

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

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

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

## Variantbestämning

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

## Rapporter och andra utdatafiler

Analysmodulerna för varianter genererar rapporter i PDF-format och tabbavgränsat format (\*.txt) som visar olika mätvärden såsom sekvenseringsdjup och variantantal. Modulerna genererar även utdatafiler såsom VCF- och gVCF-filer (genome Variant Call Format) till variantbestämningsprogram.

## Kvalitetskontrollprocedurer

NextSeq 550Dx-programvaran bedömer varje körning, prov och basbestämning mot särskilda kvalitetsmått. Positiva och negativa kontroller rekommenderas också vid beredning av bibliotek och de behöver utvärderas. Utvärdera kontrollerna enligt anvisningarna nedan:

- **Negativ kontroll (reagenskontroll utan mall) eller annan negativ kontroll:** måste generera det förväntade resultatet. Om den negativa kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från det förväntade har det inträffat ett möjligt fel i provspårningen, en inkorrekt registrering av indexprimrar eller en förorening.

- **Positivt kontrollprov:** måste generera det förväntade resultatet. Om den positiva kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från det förväntade har det inträffat ett möjligt fel i provspårningen eller en inkorrekt registrering av indexprimrar.

## Prestandaegenskaper

NextSeq 550Dx-instrumentets prestandaegenskaper fastställdes med modulerna Germline Variant (könszellvariant) och Somatic Variant (Somatisk variant) med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och bekräftades med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). Studierna omfattade provindexering, provöverföring, DNA-inmatning, analytisk sensitivitet (gräns för blankprov/detekteringsgräns), noggrannhet, precision, metodjämförelse och reproducerbarhet.

De analytiska studierna med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) utformades för att utvärdera prestandakraven som tidigare fastställts för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler). Resultaten visar att reagenskiten (v2 och v2.5) har jämförbara prestandaresultat med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. I *bipacksedeln till TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* finns mer information om prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer som exempelvis extraheringsmetoder eller interfererande substanser.

## Definitioner av beräkningar som används för prestandaegenskaper

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

## Prestanda för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler)

### Provindexering

Provindexprimrar som läggs till under beredningen av ett bibliotek ger varje prov-DNA en unik sekvens. Med de unika sekvenserna kan flera prover poolas i en enda sekvenseringskörning. Provindexering används för arbetsflödena i både Germline och Somatic. Syftet med studien var att fastställa det minsta (8) respektive största (96) antal prover som kan bearbetas i en enskild sekvenseringskörning i NextSeq 550Dx-instrumentet. Åtta unika Platinum Genome-prover testades med 12 olika indexprimerkombinationer per prov. Provresultat från fyra sekvenseringskörningar med modulen Germline Variant (Könscellsvariant) jämfördes med Platinum Genome-versionen 2016-1.0.

I den första omgången körningar testades 96 unikt indexerade provbibliotek med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser per sträng i alla 23 humana kromosomer i

avsikt att verifiera analysens förmåga att konsekvent genotypbestämma ett givet prov med olika indexprimerkombinationer. I den andra omgången körningar sekvenserades åtta unikt indexerade provbibliotek i två sekvenseringskörningar för att fastställa det minsta antalet index som stöds.

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

## Provöverföring

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

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

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

## DNA-inmatning

### Blod (Germline)

Inmatningsintervallet för blod-DNA för beredning av bibliotek med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och med hjälp av arbetsflödet i modulen Germline Variant (Könscecellvariant) har etablerats för NextSeq 550Dx-instrumentet. Det här intervallet utvärderades genom att utföra en seriespänningsstudie med 13 Platinum Genome-prover och med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Biblioteket sekvenserades i två NextSeq 550Dx-instrument med ett enda parti av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler).

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

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

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

Tabell 2 NPA för varje DNA-inmatning

DNA-inmatning (ng)	TN	FP	Saknade referensbest	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 (Somatic)

Inmatningsintervallet för formalinfixerat, paraffinbäddat (FFPE) DNA för beredning av bibliotek med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och med hjälp av arbetsflödet i modulen Somatic Variant (Somatisk variant) har etablerats för NextSeq 550Dx-instrumentet. DNA-inmatningsintervallet utvärderades genom att utföra en seriespänningsstudie med tre Platinum Genome-prover och med en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin, följt av DNA-extraktion. GM12878 späddes med GM12877 så att variantallelfrekvenserna (VAF) för 81 varianter (55 SNV:er, 10 insertioner och 16 deletioner) låg nära 0,025, 0,05 eller 0,10. Dessutom hade varje prov 91 varianter med högre variantfrekvenser på upp till 1,0 VAF. Proverna bearbetades i duplikat vid fem DNA-inmatningsnivåer med en genomsnittlig delta-kvantitativ cykel (dCq) på 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 och 7,8, uppmätt med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx för FFPE QC. Varje bibliotek sekvenserades i två NextSeq 550Dx-instrument med två partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler). För bestämning av noggrannhet jämfördes provernas variantbestämningar med Platinum Genome-versionen 2016-1.0. PPA för varje varianttyp (SNV:er, insertioner och deletioner) presenteras i [Tabell 3](#). NPA presenteras i [Tabell 4](#). Den rekommenderade DNA-inmatningen för varianterna vid 0,05 VAF eller högre är dCq ≤ 4 med 4,6 som ger en undre gräns för att motsvara prestandaegenskaperna.

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

Genomsn dCq	Varianttyp	Förväntade varianter	Förväntade saknade best	Målspädningens VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Saknade variantbest.	PPA (%)	Saknade variantbest.	PPA (%)	Saknade variantbest.	PPA (%)
2,1	SNV	808	Ej tillämpligt.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Insertion	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Deletion	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

Tabell 4 NPA för varje DNA-inmatning

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

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

Den här studien genomfördes för att utvärdera gränsen för blankprov (LoB) och detekteringsgränsen (LoD) för modulen Somatic Variant (Somatisk variant) på NextSeq 550Dx-instrumentet. Det gjordes med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin, följt av DNA-extraktion. GM12878 spädde med GM12877 så att variantfrekvenserna för 74 varianter (53 SNV:er, 7 insertioner och 14 deletioner) låg på  $0,05 \pm 0,02$ . GM12877 och spädd GM12878 (GM12878-D) testades under sex på varandra följande startdagar med ett enskilt instrument och alternerande mellan två partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) i totalt sex sekvenseringsköringar. Testet resulterade i 60 replikat för varje variant i GM12878-D och 72 replikat för varje motsvarande vildtypskoordinat i GM12877 för vardera reagensparti. LoB och LoD beräknades med hjälp av den klassiska metoden som anges i CLSI EP17-A2, med det icke-parametriska alternativet. LoB och LoD beräknades för SNV:er, insertioner och deletioner separat genom pooling av variantfrekvenserna för en given varianttyp. Typ I-fel definierades som 0,01 och typ II-fel definierades som 0,05.

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

Tabell 5 Gräns för blankprov

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

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

Tabell 6 Detekteringsgräns

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

## Noggrannhet

### Germline

Följande studie utfördes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Germline Variant (Könsellsvariant) i NextSeq 550Dx-instrumentet och med hjälp av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler). Tretton unika Platinum Genome-prover testades med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser (150 amplikoner) i 23 olika kromosomer. Sammanlagt nio körningar utfördes med tre sekvenseringsinstrument, tre reagenspartier och tre operatörer under fem startdagar. Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med en väldefinierad och sammansatt referensmetod, Platinum Genome-versionen 2016-1.0. Säkra genområden definierades baserat på den här referensmetoden om inget annat anges.

Tabell 7 Sammanfattning av överensstämmelse i Germline

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

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

<sup>2</sup>Lägsta observerade värde per provreplikat över alla nio körningar.

<sup>3</sup>Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

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

Tabell 8 Överensstämmelse i Germline per prov

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

<sup>1</sup> Totalt antal varianter i alla provreplikater över nio körningar.

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

Tabell 9 Överensstämmelse i Germline per prov, efter varianttyp

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

Provena analyserades vidare för bestämning av små insertioner och deletioner (indels). En övergripande sammanfattning presenteras i **Tabell 10**. Det fanns totalt 71 indels i storlekarna 1-24 bp för insertioner och 1-25 bp för deletioner.

Tabell 10 Sammanfattning av indeldetektering i Germline

Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbest.	PPA
Insertion	18 522	18 018	27	477	99,9
Deletion	17 388	17 073	0	315	100



Den representativa analysen bestod av 150 ampliconer utformade för att täcka ett brett spektrum av genomiskt innehåll. Ampliconernas GC-innehåll varierade inom 0,19-0,87. Ampliconerna hade även en rad olika enkelnukleotid- (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotiduppreningar. Data sammanställdes per amplicon (Tabell 11) för att fastställa det genomiska innehållets effekt på procentandelen korrekta bestämningar. Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar.

Tabell 11 Noggrannhet på ampliconnivå i Germline

Amplicon	Kromosom	Ampliconens start	Ampliconens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Ampliconens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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
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

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Poly T (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	Ej tillämpligt	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
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

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,49	65 520	0	0	100
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	66 339	0	0	100
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,65	81 900	0	0	100
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
76	11	120 357 801	120 357 885	85	85	Poly A (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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
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	Poly A (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	Ej tillämpligt	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
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	Ej tillämpligt	0,48	53 235	0	0	100
124	19	625 143	625 241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	81 081	0	0	100
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	60 605	1	0	100
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	57 330	0	0	100
127	20	746 056	746 149	94	94	Ej tillämpligt	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

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best.	Felaktiga best.	Saknade best.	% korrekta best.
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,52	58 149	0	0	100
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt

Resultaten från sekvenseringen av prov NA12878 jämfördes med en mycket säker genotyp för NA12878 som etablerats av National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Av de 150 ampliconerna låg 92 helt inom i de mycket säkra genområdena, 41 överlappade delvis och 17 ampliconer överlappade inte alls NIST-sekvensen. Utfallet gav 10 000 koordinater per replikat att jämföra. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Resultaten med avseende på noggrannhet visas i [Tabell 12](#).

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

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

Baserat på data från den här Germline-studien med nio körningar kan NextSeq 550Dx-instrumentet sekvensera följande innehåll konsekvent:

- ▶ GC-innehåll  $\geq 19$  % (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer med 19 % GC-innehåll bestämdes korrekt med 0,6 % saknade bestämningar)
- ▶ GC-innehåll  $\leq 87$  % (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer med 87 % GC-innehåll bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- ▶ PolyA-längder  $\leq 9$  (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyA-upprepning med 9 nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- ▶ PolyT-längder  $\leq 10$  (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyT-upprepning med 10 nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- ▶ PolyG-längder  $\leq 7$  (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyG-upprepning med 7 nukleotider bestämdes korrekt med 1,0 % saknade bestämningar)
- ▶ PolyC-längder  $\leq 6$  (alla bestämda baser i 2 457 sekvenserade ampliconer innehållande en PolyC-upprepning med 6 nukleotider bestämdes korrekt utan saknade bestämningar)
- ▶ dinukleotidupprepningenslängder  $\leq 11x$  (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 11x dinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- ▶ trinukleotidupprepningenslängder  $\leq 5x$  (alla bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 5x trinukleotidupprepning bestämdes korrekt med 0,5 % saknade bestämningar)
- ▶ insertionslängder  $\leq 24$  (66 343 av 66 370 bestämda baser i 819 sekvenserade ampliconer innehållande en 24-nukleotidinsertion bestämdes korrekt med 1,2 % saknade bestämningar, inga felaktiga bestämningar inträffade i området innehållande 24-nukleotidinsertionen)
- ▶ deletionslängder  $\leq 25$  (alla bestämda baser i 2 457 sekvenserade ampliconer innehållande en 25-nukleotiddeletion bestämdes korrekt utan saknade bestämningar).

### Somatic

Studien som beskrivs här användes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) i NextSeq 550Dx-instrumentet och med hjälp av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler).

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

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

Tabell 13 Sammanfattning av överensstämmelse i Somatic

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

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

<sup>2</sup>Lägsta observerade värde per provreplikant över alla nio körningar.

<sup>3</sup>Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

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

Tabell 14 Överensstämmelse i Somatic per prov

Prov	Genomsn best.frekv	Förväntad	TP	FN	Saknade variantbest.	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

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

Tabell 15 Överensstämmelse i Somatic per prov, efter varianttyp

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



Prov	SNV:er			Insertioner			Deletioner		
	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN
GM12878-D5	5 454	5 192	28	1 782	1 651	9	2 052	1 856	5
GM12878-D7	5 454	5 445	0	1 782	1 719	0	2 052	1 944	0

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

Tabell 16 Sammanfattning av indeldetektering i Somatic

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

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

Tabell 17 Noggrannhet på ampliconnivå i Somatic

Amplicon	Kromosom	Ampliconens start	Ampliconens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Ampliconens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Poly T (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	Ej tillämpligt	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	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,49	30 217	0	28	99,9
66	10	118 351 373	118 351 453	81	81	Ej tillämpligt	0,51	30 531	0	96	99,7
67	11	8 159 816	8 159 912	97	96	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,65	37 785	0	24	99,9
70	11	59 837 679	59 837 740	62	62	Indel	0,37	23 368	0	68	99,7

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
71	11	64 418 856	64 418 957	102	102	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Poly A (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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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
96	15	77 879 807	77 879 901	95	93	Poly G (5), indel	0,68	34 745	0	432	98,8

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Poly A (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	Ej tillämpligt	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
122	18	54 815 665	54 815 749	85	85	CT (3), indel	0,45	31 969	0	161	99,5

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
123	18	59 773 996	59 774 060	65	65	Ej tillämpligt	0,48	24 531	0	48	99,8
124	19	625 143	625 241	99	99	Ej tillämpligt	0,59	37 298	0	124	99,7
125	19	18 121 418	18 121 491	74	74	Ej tillämpligt	0,68	27 881	0	109	99,6
126	19	18 186 574	18 186 643	70	70	Ej tillämpligt	0,64	26 442	0	26	99,9
127	20	746 056	746 149	94	94	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	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	Ej tillämpligt	0,52	26 780	0	58	99,8
148	Y	2 655 397	2 655 461	65	0	Ej tillämpligt	0,55	0	0	0	Ej tillämpligt

Amplikon	Kromosom	Amplikonens start	Amplikonens slut	Analyserad fragmentstorlek	Baser i konfidensområden	Amplikonens genomiska innehåll	GC-innehåll	Korrekta best	Felaktiga best	Saknade best	% korrekta best
149	Y	2 655 519	2 655 609	91	0	Ej tillämpligt	0,48	0	0	0	Ej tillämpligt
150	Y	2 655 609	2 655 679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Ej tillämpligt



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

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

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

Baserat på data från den här Somatic-studien med nio köringar kan NextSeq 550Dx-instrumentet sekvensera följande innehåll konsekvent:

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

## Precision

NextSeq 550Dx-instrumentets precision fastställdes genom att testa 13 unika Platinum Genome-prover med tre instrument, tre reagenspartier och tre operatörer för att skapa nio sekvenseringsköringar under fem startdagar. Representativ analys, prover och referensmetod är desamma som dem beskrivna för studien av noggrannhet i Germline. Precisionen fastställdes genom varianskomponentanalys med VAF som responsvariabel och beräkning av standardavvikelse på komponentnivå för instrument, reagensparti, operatör och startdag (**Tabell 19**). Det totala antalet observationer som användes i analysen för varje komponent av instrumentens, operatörernas eller reagenspartiernas variabilitet var 699, 176 och 235 för respektive SNV:er, insertioner och deletioner.

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

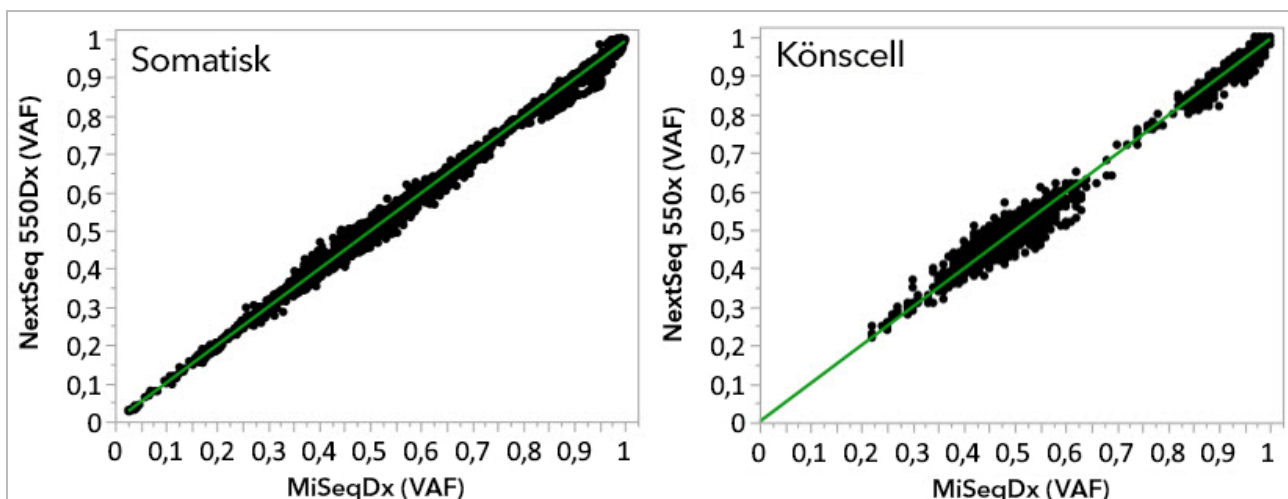
Komponent	Varianttyp	Komponentens SD		Total SD	
		Max.	Median	Max.	Median
Parti	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Insertion	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Deletion	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187

Komponent	Varianttyp	Komponentens SD		Total SD	
		Max.	Median	Max.	Median
Instrument	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Insertion	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Deletion	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatör	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Insertion	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Deletion	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Dag	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Insertion	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Deletion	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

### Metodjämförelse (sekvenseringsplattform)

Helblodsprover och FFPE-prover analyserades i NextSeq 550Dx-instrumentet och MiSeqDx-instrumentet med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx och arbetsflödena i Germline och Somatic. Variantfrekvensernas överensstämmelse för blod- och FFPE-prover utvärderades med flera representativa analyser. Bild 2 illustrerar VAF-korrelationen mellan de två instrumenten för en representativ analys och Tabell 20 sammanfattar korrelationen efter analyspanel. Baserat på den starka korrelationen mellan MiSeqDx-instrumentet och NextSeq 550Dx-instrumentet har prestandaegenskaperna relaterade till preanalytiska faktorer (exempelvis extraheringsmetoder eller interfererande substanser) fastställts gälla för båda instrumenten. I bipacksedeln till TruSeq Custom Amplicon Kit Dx finns mer information.

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



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

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

<sup>1</sup>Två datapunkter har tagits bort baserat på de angivna begränsningarna för modulen Germline Variant (Könscellsvariant).

<sup>2</sup>Bestämningkoefficient för VAF-diagram enligt illustrationen i figur 2.

## Reproducerbarhet

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

Testerna utfördes vid tre externa laboratorier med ett parti av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler). Ett enda NextSeq 550Dx-instrument användes vid varje laboratorium. Två operatörer utförde testningen vid varje laboratorium. Varje operatör utförde testningen tre startdagar som inte följde på varandra för varje provtyp. Sammanlagt gjordes 36 körningar på de tre laboratorierna. Testningen gav 18 körningar vardera för arbetsflödena i Germline respektive Somatic.

### Germline

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

Tabell 21 Observerade köns-cellsbestämningar för förväntade positiva resultat, efter varianttyp

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

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

Tabell 22 Observerade köns-cellsbestämningar för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Saknade best			Korrekt negativa best				
	Observerade	Totalt	Procentandel	Observerade	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
Vildtyp	4 883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Köns-cellsvarianter med  $VAF \geq 0,2$  och  $< 0,7$  bestäms som positiva heterozygoter för varianten och varianter med  $VAF \geq 0,7$  bestäms som positiva homozygoter för varianten. Köns-cellsprover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen. C<sub>x</sub> fastställdes för vardera cutoff (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF var C<sub>x</sub>  $\geq 99,999\%$ , vilket indikerar att  $\geq 99,999\%$  av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som heterozygota. För övre cutoff på 0,7 VAF fastställdes C<sub>x</sub>  $\leq 0,001\%$ , vilket indikerar att  $\leq 0,001\%$  av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som homozygota. **Tabell 23** sammanfattar resultaten per varianttyp.

Köns-cellsvarianter med  $0,2 \leq VAF < 0,7$  bestäms som positiva heterozygoter för varianten och varianter med  $VAF \geq 0,7$  bestäms som positiva homozygoter för varianten. Köns-cellsprover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen. C<sub>x</sub> fastställdes för vardera cutoff (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider

cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF var  $Cx \geq 99,999\%$ , vilket indikerar att  $\geq 99,999\%$  av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som heterozygota. För övre cutoff på 0,7 VAF var  $Cx \leq 0,001\%$ , vilket indikerar att  $\leq 0,001\%$  av de heterozygota varianterna skulle bestämmas som homozygota. **Tabell 23** sammanfattar resultaten per varianttyp.

Tabell 23 Cx-värden för heterozygota varianter i Germline

Varianttyp	Cutoff vid 0,2 VAF	Cutoff vid 0,7 VAF
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Insertioner	24/24	24/24
Deletioner	35/35	35/35
Totalt	153	153

### Somatic

Somatiska varianter med VAF  $\geq 0,026$  rapporteras som positiva (variant). Observationer med VAF  $\geq 0,01$  och  $< 0,026$  betraktades som osäkra för den här analysen (varken positiva eller negativa, flaggade som låg variantfrekvens).

Resultaten beräknades på följande tre sätt för att utvärdera prestandan:

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

De tre tabellerna **Tabell 24**, **Tabell 25** och **Tabell 26** sammanfattar bestämningsresultaten för bästa fall, sämsta fall och uteslutningsfall, tillsammans med den lägre och högre 95 % konfidensnivån (LCL/UCL) som beräknas med Wilson Score-metoden.

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

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

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

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

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

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

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

Tabell 27 Observerade somatiska bestämningar för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Saknade best			Korrekta bestämningar						
	Observerade	Totalt	Procentandel	Osäkra	Inkorrekta	Korrekta	Totalt	Procentandel	95 % LCL	95 % UCL
Vildtyp	36 326	8 909 676	0,408	2 254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

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

Tabell 28 Sammanfattning av C95 i Somatic

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

## Prestanda för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler)

### Översikt

Två reagenskit kan användas med NextSeq 550Dx: NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). För att visa att NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) kan uppfylla de analytiska prestandakrav som verifierats och validerats hos NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) har studier utförts med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). Två biblioteksberedningar med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx utfördes, den ena med arbetsflödet för könseller och den andra med det somatiska arbetsflödet. Bibliotek från varje arbetsflöde testades med tre partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) och tre NextSeq 550Dx-instrument. Dessutom innehöll testningen för varje arbetsflöde en enstaka körning med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler).

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

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

Testningen innehöll två LoD-prover som var och en hade en unik uppsättning varianter med målvärdet 0,05 VAF och motsvarande LoB-prover som var vildtyp för riktade varianter. För biblioteksberedningen behandlades LoD- och LoB-prover i replikat om åtta respektive sju med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Först sekvenserades bibliotek med

NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) för att identifiera varianter/genomiska koordinater för LoB/LoD-utvärdering med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). Alla varianter med genomsnittlig VAF på 0,045-0,055 (LoD-varianter) baserat på resultaten från NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) användes för LoD-analys (N = 51 varianter). De 51 motsvarande genomiska koordinaterna utvärderades för LoB-analysen.

För utvärdering av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) sekvenserades bibliotek i tre körningar under tre på varandra följande dagar med samma instrument och parti av reagenskit. Denna testning resulterade i 24 replikat för var och en av de 51 LoD-varianterna och 21 replikat för var och en av motsvarande vildtypspositioner. Andelen vildtypsbestämningar med VAF < 0,026 finns i [Tabell 29](#). Andelen LoD-variantbestämningar där VAF är större än eller lika med 0,026 visas i [Tabell 30](#).

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

Varianttyp	Utvärderade positioner	Totalt antal observationer	Antal VAF-mätningar ≥ 2,6%	Andel < 2,6 %	Andel 95 % konfidensintervall
SNV	32	672	0	1	0,994-1
Insertion	11	231	0	1	0,984-1
Deletion	8	168	0	1	0,978-1

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

Varianttyp	Utvärderade positioner	Totalt antal observationer	Antal VAF-mätningar < 2,6 %	Antal VAF-mätningar ≥ 2,6%	Andel ≥ 2,6%	Andel 95 % konfidensintervall
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993-1
Insertion	11	264	3	261	0,989	0,967-0,996
Deletion	8	192	2	190	0,99	0,963-0,997

## Noggrannhet

### Germline

Följande studie utfördes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Germline Variant (Könsellsvariant) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). Tolv unika Platinum Genome-prover analyserades med en representativ analys. Sammanlagt elva körningar utfördes med tre NextSeq 550Dx-instrument och tre NextSeq 550Dx högproduktiva reagenskit v2.5 (300 cykler).

Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden Platinum Genomes version 2016-1.0. Noggrannhetsresultat från en enda sekvenseringskörning med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) tillhandahålls som referens. En sammanfattning av resultaten finns i [Tabell 31](#).

Tabell 31 Sammanfattning av överensstämmelse i Germline

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

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

<sup>2</sup>Lägsta observerade värde per provreplikat över alla körningar (baserat på elva körningar för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5).

<sup>3</sup>Lägsta observerade värde per provreplikat över en körning (sammanlagt 96 observationer).

<sup>4</sup>Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

## Somatic

Nedanstående studie utfördes för att utvärdera noggrannheten vid variantbestämning med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) i NextSeq 550Dx-instrumentet och med hjälp av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler). Tio Platinum Genome FFPE-prover (två med varianter utspädda till 0,05 VAF) testades med en representativ analys. Sammanlagt elva körningar utfördes med tre NextSeq 550Dx-instrument och tre partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).

Noggrannheten fastställdes för SNV:er, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med den väldefinierade och sammansatta referensmetoden Platinum Genomes version 2016-1.0. Noggrannhetsresultat från en enda sekvenseringskörning med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) tillhandahålls som referens. En sammanfattning av resultaten finns i [Tabell 32](#).

Tabell 32 Sammanfattning av överensstämmelse i Somatic

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

<sup>1</sup>Beräknas som antalet prover per körning x antal körningar (48 prover per körning x 11 körningar = 528 observationer).

<sup>2</sup>Lägsta observerade värde per provreplikat över alla körningar (baserat på elva körningar för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5).

<sup>3</sup>Lägsta observerade värde per provreplikat över en körning (sammanlagt 96 observationer).

<sup>4</sup>Lägsta värde när data från varje körning analyseras i sammanställd form.

## Precision

### Germline

Precisionen av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) med modulen Germline Variant (Könsellsvariant) utvärderades med Platinum Genome-prover och en representativ analys. I testningen användes en enda biblioteksberedning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Tolv prover som behandlats med åtta replikat vardera testades. Biblioteken sekvenserades med tre partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) och tre NextSeq 550Dx-instrument för sammanlagt nio sekvenseringskörningar.

Prover med heterozygota varianter användes för att fastställa om analysens inneboende variabilitet skulle påverka genotypbestämningen (N = 153 unika heterozygota varianter). Cx fastställdes för vardera cutoff för modulen Germline Variant (Könsellsvariant) (0,2 för heterozygota och 0,7 för homozygota genotyper), där x utgör andelen upprepade tester som överskrider cutoff. För nedre cutoff på 0,2 VAF var varianten med minsta Cx för NextSeq 550Dx reagenskit v2.5 (300 cykler) > 99,9 %, vilket visar att > 99,9 % av heterozygotvarianterna skulle bestämmas som heterozygoter. För övre cutoff på 0,7 VAF var varianten med maximalt Cx för NextSeq 550Dx reagenskit v2.5 (300 cykler) < 1,5 %, vilket visar att ≤ 1,5 % av heterozygota varianter skulle bestämmas som homozygota. [Tabell 33](#) sammanfattar resultaten per varianttyp. Cx-värden från den enda sekvenseringskörningen med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) tillhandahålls som referens.

Tabell 33 Cx-värden för heterozygota varianter i Germline

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

<sup>1</sup>Cx-värden baserade på uppskattningar av total standardavvikelse från varianskomponentanalys.

<sup>2</sup>Cx-värden baserade på standardavvikelse för prov.

### Somatic

Precisionen av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) tillsammans med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) utvärderades med Platinum Genome FFPE-prover och en representativ analys. I testningen användes en enda biblioteksberedning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Två prover med åtta replikat vardera testades. Biblioteken sekvenserades med tre partier av NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) och tre NextSeq 550Dx-instrument för sammanlagt nio sekvenseringskörningar.

Somatiska varianter med förväntade VAF-nivåer  $\leq 0,10$  VAF (N = 131 unika varianter) användes för att utvärdera instrumentets variabilitet i närheten av cutoff för modulen Somatic Variant (Somatisk variant) (somatiska varianter med VAF-nivå  $\geq 0,026$  kallas positiva för varianten). C95-värden fastställdes för varje somatisk variant. C95-värden representerar vid vilken VAF sannolikheten att vara större än VAF-cutoff för modulen Somatic Variant (Somatisk variant) är 95 %. De högsta C95-värdena efter varianttyp visas i [Tabell 34](#). C95-värden från en enda sekvenseringskörning med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) tillhandahålls som referens.

Tabell 34 Sammanfattning av C95 i Somatic

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

<sup>1</sup>C95-värden baserade på uppskattningar av total standardavvikelse från varianskomponentanalys.

<sup>2</sup>C95-värden baserade på standardavvikelse för prov.

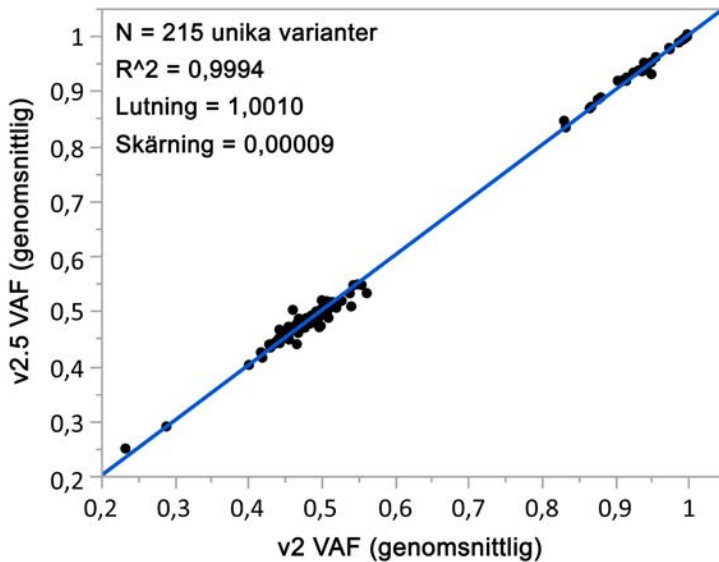
## Metodjämförelse (reagenskit)

### Germline

Genomsnittliga VAF från 215 unika varianter utvärderades med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) med resultat som erhållits från modulen Germline Variant (Könscellsvariant). VAF-medelvärden beräknades från elva sekvenseringskörningar (v2.5) och en sekvenseringskörning (v2). Minst åtta replikat användes för att räkna ut medelvärdet för varje variant. [Bild 3](#) illustrerar VAF-korrelationen mellan de två reagenskiten. Baserat på den starka linjära VAF-korrelationen och reagenskitens liknande resultat har prestandaegenskaperna som ursprungligen verifierats och validerats hos NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) med modulen Germline Variant (Könscellsvariant) fastställts gälla för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).



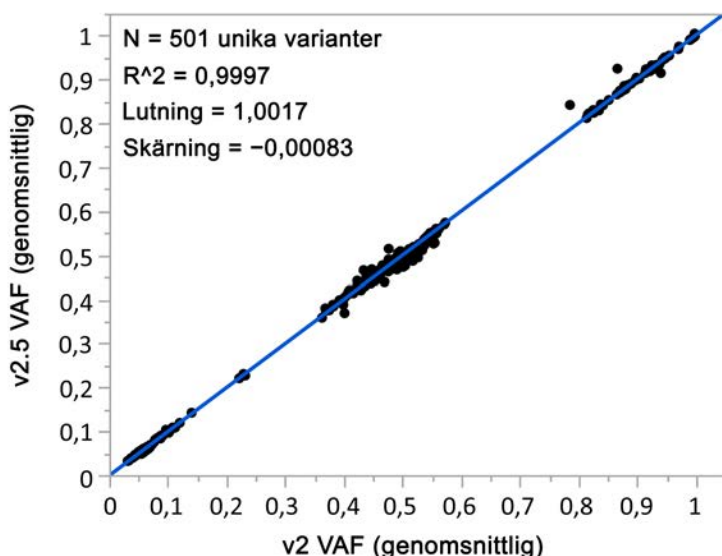
Bild 3 VAF-korrelation i modulen Germline Variant (Könsellsvariant) mellan NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).



### Somatic

Genomsnittliga VAF från 501 unika varianter utvärderades med NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler) med resultat som erhöles från modulen Somatic Variant (Somatisk variant). VAF-medelvärden beräknades från elva sekvenseringskörningar (v2.5) och en sekvenseringskörning (v2). Minst tre replikat användes för att räkna ut medelvärdet för varje unik variant. Bild 4 illustrerar VAF-korrelationen mellan de två reagenskiten. Utifrån VAF-korrelationen och reagenskitens liknande resultat har prestandaegenskaperna som verifierats och validerats hos NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) fastställts gälla för NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).

Bild 4 VAF-korrelation i modulen Somatic Variant (Somatisk variant) mellan NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2 (300 cykler) och NextSeq 550Dx högproduktivt reagenskit v2.5 (300 cykler).



## Patent och varumärken

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

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

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

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

© 2021 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformation



Illumina  
 5200 Illumina Way  
 San Diego, California 92122 USA  
 +1 800-8094566  
 +1 858-2024566 (utanför Nordamerika)  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



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

### Australisk sponsor

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

## Märkning av produkter

En fullständig lista över symbolerna på produktens förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på [support.illumina.com](https://support.illumina.com), under fliken *Documentation and Literature* (Dokumentation och litteratur) för respektive produkt.