

Bipacksedel

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISK ANVÄNDNING
ENDAST FÖR EXPORT

Avsedd användning

NovaSeq 6000Dx Instrument är avsedd för sekvensering av DNA-bibliotek när den används med *in vitro*-diagnostiska (IVD) analyser. NovaSeq 6000Dx Instrument är avsedd att användas med specifika registrerade, certifierade eller godkända IVD-reagenser och analytisk programvara.

Grundläggande principer

Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument är avsedd för sekvensering av DNA-bibliotek med *in vitro*-diagnostiska analyser. För sin inmatning NovaSeq 6000Dx använder den bibliotek genererade från DNA där provindex och infångningssekvenser läggs till amplifierade mål. Provbibliotek fångas upp i en flödescell och sekvenseras av instrumentet med hjälp av SBS-kemi (sekvensering genom syntes). I SBS-kemi används en metod med reversibel terminator för att detektera fluorescensmärkta enkelnukleotidbaser när de införlivas i växande DNA-strängar. Programvaran Real-Time Analysis (RTA) utför bildanalys och basbestämning samt tilldelar en kvalitetspoäng till varje bas för varje sekvenseringscykel. När den primära analysen är klar kan sekundär analys utföras på de inkluderade och nödvändiga Illumina DRAGEN Server för NovaSeq 6000Dx för att behandla basbestämning. NovaSeq 6000Dx använder olika sekundära analysapplikationer beroende på arbetsflödet. För DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen inkluderar bearbetning demultiplexering, FASTQ-filgenerering, justering, variantbestämning och generering av filer i variantbestämningsformat (VCF och gVCF). VCF- och gVCF-filerna innehåller information om antingen könszell eller somatiska varianter (beroende på valt arbetsflöde) som finns på specifika positioner i ett referensgenom.

Dubbelt driftläge

NovaSeq 6000Dx innehåller en enstaka starthårdisk med separata lägen för *in vitro*-diagnostik (IVD) och endast forskningsanvändning (RUO). Läget väljs med en växlingsknapp på skärmen Sequencing (Sekvensering). Det valda läget är tydligt märkt i gränssnittet på alla skärmar. IVD-sekvensanalyser, inklusive DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen i antingen könszell- och eller somatiska arbetsflöden, exekveras i IVD-läge. Endast IVD-sekvensreagens kan användas i IVD-läge. Prestandaegenskaper och begränsningar av proceduren för NovaSeq 6000Dx har upprättats med hjälp av DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen i IVD-läge.

Begränsningar

1. Endast för *in vitro*-diagnostiskt bruk.

2. DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen, när den används med NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) kan leverera:
 - Sekvenseringsutgång:
 - $\geq 1,0$ terabaser (TB) med S2-satsen
 - $\geq 3,0$ TB med S4-satsen
 - Läslängd (i parad slutkörning) 2 x 150 baspar (bp).
 - Baser högre än Q30 ≥ 85 % vid avläsningslängd på 2 x 150 bp. Lika eller mer än 85 % av basbestämningarna har kvalitetspoäng i Phred-skala som är större än 30, vilket indikerar en noggrannhet på basbestämning som är större än 99,9 %.
3. Insertioner med längd > 18 bp och deletioner med längd > 21 bp har inte validerats.
4. Större varianter, som multinukleotidvarianter (MNV) och större indels, kan komma att rapporteras som separata mindre varianter i VCF-utdatafilen.
5. Små MNV rapporteras som separata varianter i den utgående VCF-filen.
6. Deletioner rapporteras i VCF-filen vid koordinaten för föregående bas per VCF-format. Därför bör angränsande varianter övervägas innan en enskild basbestämning rapporteras som en homozygot referens.
7. Könslinjespecifika begränsningar:
 - NovaSeq 6000Dx använder Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen och är utformad för att leverera kvalitativa resultat för bestämning av könscellvarianter (t.ex. homozygot, heterozygot, vildtyp).
 - Variation i antal kopior kan påverka om en variant identifieras som homozygot eller heterozygot.
 - Systemet kommer inte att rapportera mer än två varianter på ett enda ställe, även i närvaro av kopienummervariationer.
8. Begränsningarna nedan gäller specifikt för Somatic:
 - NovaSeq 6000Dx använder Somatic FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen och är utformad för att leverera kvalitativa resultat för somatisk variantbestämning (dvs. förekomst av en somatisk variant).
 - Arbetsflödet för generering av Somatic FASTQ och VCF kan inte skilja mellan könscellvarianter och somatiska varianter. Arbetsflödet är utformat för att upptäcka varianter över en rad variantfrekvenser men variantfrekvens kan inte användas för att skilja somatiska varianter från könscellvarianter.
 - Normal vävnad i provet påverkar detekteringen av varianter. Den rapporterade detekteringsgränsen baseras på en variantfrekvens som förhåller sig till det totala DNA som extraheras från både tumörvävnad och normal vävnad.
 - Om mer än en variantallel bestäms på samma lokus kommer ingen av allelerna att rapporteras som passerande varianter. Istället kommer hela uppsättningen av alleler att rapporteras men filtreras via den multialleliska taggen.

Kvalitetskontrollprocedurer

Programvaran NovaSeq 6000Dx utvärderar varje körning, prov och basbestämning mot kvalitetskontrollmått. Positiva och negativa kontroller rekommenderas vid biblioteksberedning och bör utvärderas. Utvärdera kontrollerna enligt följande.

- Negativ kontroll (ingen mallkontroll) eller annan negativ kontroll – Måste generera det förväntade resultatet. Om den negativa kontrollen genererar ett resultat som skiljer sig från vad som förväntas, har ett möjligt fel i provspårningen, felaktig registrering av indexeringsprimrar eller kontaminering inträffat.
- Positivt kontrollprov—måste generera det förväntade resultatet. Om den positiva kontrollen genererar ett annat resultat än vad som förväntas har ett möjligt fel i provspårningen eller felaktig registrering av indexeringsprimrar inträffat.

Produktkomponenter

Illumina NovaSeq 6000Dx består av följande:

1. NovaSeq 6000Dx Instrument (Katalognr 20068232)
2. Programvarukomponenter för NovaSeq 6000Dx Instrument inkluderar följande:

Programvara	Installationsplats	Funktion	Beskrivning
NovaSeq operativprogramvara	NovaSeq 6000Dx	Styr drift av instrumentet	NovaSeq operativprogramvara (NVOS) hanterar driften av instrumentet under sekvensering och genererar bilder för användning av programvaran Real-Time Analysis (RTA).
Realtidsanalysprogramvara (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Utför primär analys	RTA-programvaran konverterar bilderna som genereras av NVOS för varje bricka per cykel av sekvenseringskörningen till basbestämningsfiler. Basbestämningsfilerna är indata för applikationsmodulerna på Illumina DRAGEN Server för NovaSeq 6000Dx. RTA-programmet innehåller inget användargränssnitt.

Programvara	Installationsplats	Funktion	Beskrivning
illumina Run Manager	illumina DRAGEN Server	Kontroller kör installation och hantering	illumina Run Manager tillhandahåller användar- och instrumenthantering, är värd för applikationsmjukvaran och möjliggör användning av DRAGEN hårdvaruaccelererade genomics sekundära analysmoduler.

Driftförhållanden

För mer information om driftförhållanden, se avsnittet Miljöfaktorer att beakta i *NovaSeq 6000Dx Instrument Produktdokumentation*.

Element	Specifikation
Temperatur	Bibehåll en temperatur på 19 °C till 25 °C (22 °C ± 3 °C) i laboratoriet. Denna temperatur är instrumentets drifttemperaturområde. Under en körning får omgivningstemperaturen inte variera med mer än ±2 °C.
Luftfuktighet	Bibehåll en icke-kondenserande relativ luftfuktighet på 20–80 %. Systemet bör användas på en drifthöjd av 2 000 meter eller lägre.

Förbrukningsmaterial och utrustning

Det här avsnittet listar allt som behövs för en NovaSeq 6000Dx-sekvenseringskörning. Detta inkluderar av illumina levererade förbrukningsmaterial och tillhörande förbrukningsmaterial och utrustning som du måste köpa från andra leverantörer. Dessa artiklar krävs för att slutföra protokollet och för att utföra underhålls- och felsökningsprocedurer.

För information om symbolerna på förbrukningsmaterial eller deras förpackningar, se [Symbolförklaring för illumina IVD \(dokument nr 1000000039141\)](#).

Förbrukningsmaterial för sekvensering

En NovaSeq 6000Dx-körning kräver följande komponenter:

- Buffertkassett
- Klusterkassett
- Flödescell
- Biblioteksror
- SBS-kassett

NovaSeq 6000Dx förbrukningsmaterial är förpackade i följande konfigurationer. Varje komponent använder radiofrekvensidentifiering (RFID) för exakt spårning av förbrukningsmaterial och kompatibilitet.

Tabell 1 Illumina-Medföljande förbrukningsmaterial

Satsnamn	Innehåll	Illumina Katalognummer
NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler)	S2-klusterkassett S2-flödescell S2 SBS-kassett	20046931
NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler)	S4-klusterkassett S4-flödescell S4 SBS-kassett	20046933
NovaSeq 6000Dx S2-buffertkassett	S2-buffertkassett	20062292
NovaSeq 6000Dx S4-buffertkassett	S4-buffertkassett	20062293
NovaSeq 6000Dx Biblioteksror	Enkelt biblioteksror	20062290
NovaSeq 6000Dx Biblioteksror, 24-pack	24 biblioteksror	20062291

När du får dina förbrukningsmaterial, förvara komponenterna omedelbart vid den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Tabell 2 NovaSeq 6000Dx Förvaring av sats

Förbrukningsmaterial	Antal	Förvaringstemperatur	Längd	Bredd	Höjd
Flödescell	1	2 °C till 8 °C	27,7 cm (10,9 in)	17 cm (6,7 in)	3,8 cm (1,5 in)
Klusterkassett	1	-25 °C till -15 °C	29,5 cm (11,6 in)	13 cm (5,1 in)	9,4 cm (3,7 in)
SBS-kassett	1	-25 °C till -15 °C	30 cm (11,8 in)	12,4 cm (4,9 in)	11,2 cm (4,4 in)
Buffertkassett	1	15 °C till 30 °C	42,2 cm (16,6 in)	20,6 cm (8,1 in)	21,1 cm (8,3 in)
Biblioteksror	1	15 °C till 30 °C	4,1 cm (1,6 in)	2,3 cm (0,9 in)	12,4 cm (4,9 in)

Förbrukningsmaterial Detaljer

För att identifiera kompatibla satskomponenter är flödesceller och kassetter märkta med symboler som visar satsläget.

Tabell 3 Kompatibilitetsmärkning

Satsläge	Märkning	Beskrivning
S2-satskomponenter	S2	S2-flödescell genererar upp till 4,1 miljarder enkelläsning passerfilter med uteffekt upp till 1 000 Gb vid 2 x 150 bp. S2-flödescellen ger snabb sekvensering för de flesta applikationer med hög genomströmning.
S4-satskomponenter	S4	S4-flödescell genererar upp till 10 miljarder enkelläsning passerfilter med en uteffekt på upp till 3 000 Gb vid 2 x 150 bp. S4-flödescellen är en fyrfilig version av flödescellen, designad för maximal effekt.

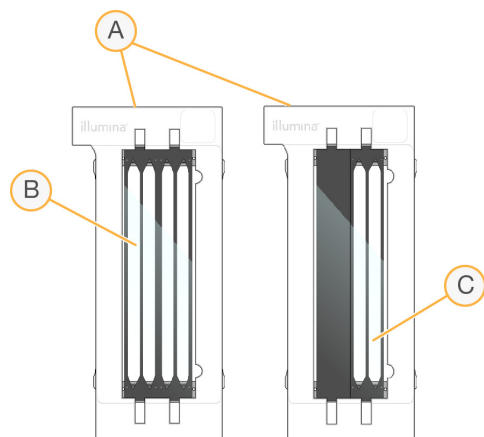
Flödescell

NovaSeq 6000Dx flödescell är en mönstrad flödescell inpackad i en kassett. Flödescellen är ett glasbaserat substrat som innehåller miljarder nanobrunnar i ett ordnat arrangemang. Kluster genereras i nanobrunnarna från vilka sekvensering sedan utförs.

Varje flödescell har flera banor för sekvensering av poolade bibliotek. S2-flödescellen har två banor och S4-flödescellen har fyra. Varje körfält avbildas i flera strängar och programvaran delar sedan upp bilden av varje sträng i mindre delar som kallas brickor.

Vissa repor och andra smärre kosmetiska defekter på flödescellen är normala och förväntas inte äventyra datakvalitet och utbyte. Illumina rekommenderar att dessa flödesceller används som normalt.

Figur 1 Flödesceller



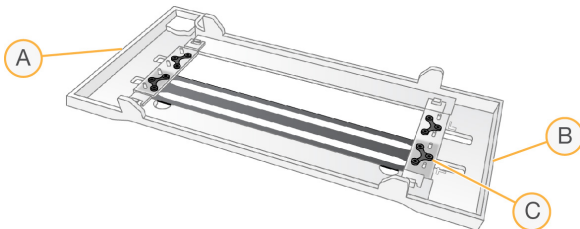
- A. Flödescellskassett
- B. Fyrfilig flödescell (S4)
- C. Tvåfilig flödescell (S2)

Undersidan av varje flödescell har flera packningar. Bibliotek och reagens kommer in i flödescellsbanorna genom packningarna på flödescellens inloppsände. Använda reagens stöts ut från i flödescellsbanorna genom packningarna på utloppsändan.

**FÖRSIKTIGHET**

Undvik att röra vid packningarna när du hanterar flödescellen.

Figur 2 Inverterad flödescell



- A. Utloppsände
- B. Inloppsände
- C. Packning (en av fyra)

Buffert-, kluster- och SBS-kassettdetaljer

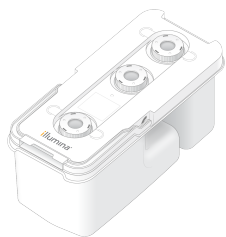
Buffert-NovaSeq 6000Dx, kluster- och SBS kassetter har folieförseglade reservoarer förfyllda med reagenser, buffertar och tvättlösning. Kluster- och SBS-kassetter ingår i NovaSeq 6000Dx-reagenssatser.



Buffertkassetten säljs separat.

Kassetterna laddas direkt på instrumentet och är färgkodade och märkta för att minska laddningsfel. Styrningar i reagenskylaren och buffertlådorna säkerställer korrekt orientering.

Tabell 4 NovaSeq 6000Dx Kassetter

Förbrukningsmaterial	Beskrivning
Buffertkassett	Förfylld med sekvensbuffertar och väger upp till 6,8 kg (15 lb). Ett plasthandtag underlättar transport, lastning och lossning.
	Buffertkassetten innehåller reagens som är känsliga för ljus. Förvara buffertbehållaren förpackad fram till användning.

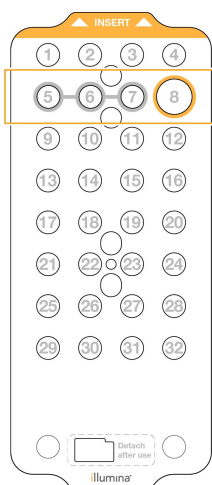


Förbrukningsmaterial	Beskrivning
 <p>Klusterkasset</p>	<p>Förfylld med klustring, indexering och parade reagenser och tvättlösning. Inkluderar en avsedd position för biblioteksörret. Orange märkning skiljer klusterkassetten från SBS-kassetten.</p> <p>Ett denatureringsreagens i position nr 30 innehåller formamid, som är en organisk amid och reproduktionstoxin. För att underlätta en säker kassering av eventuellt oanvänt reagens efter sekvenseringskörningen är denna reservoar borttagbar.</p>
 <p>SBS-kasset</p>	<p>Förfylld med sekvenseringsreagens i volymer som är specifika för antalet cykler som satsen stöder. Var och en av de tre reagenspositionerna har en intilliggande position reserverad för den automatiska efterkörningen. Grå märkning skiljer SBS-kassetten från klusterkassetten.</p> <p>SBS-kassetten innehåller reagens som är känsliga för ljus. Förvara SBS-behållaren förpackad fram till användning.</p>

Reserverade klusterkassettreservoarer

Tre reservoarer är reserverade för anpassade primers och en tom position är reserverad för biblioteksörret. För provspårbarhet laddas biblioteksörret i klusterkassetten under körningsinställningen och förblir med kassetten under slutet av körningen.

Figur 3 Numrerade behållare



Tabell 5 Klusterkassettreservoarer

Position	Reserverat för
5, 6 och 7	Valfria anpassade primers
8	Biblioteksör

Förbrukningsmaterial och utrustning som tillhandahålls av användaren

Tabell 6 Förbrukningsmaterial

Förbrukningsmaterial	Tillverkare	Användningsområde
Centrifugerflaska, 500 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning	Spädning av Tween 20 för en underhållstvätt.
Centrifugerör, 30 ml	Valfri leverantör av laborieutrustning	Spädning av NaOCl för en underhållstvätt.
Engångshandskar, puderfria	Valfri leverantör av laborieutrustning	Allmänt bruk.
Isopropanolservetter, 70 % eller Alkoholservetter, 70 %	VWR, katalog nr 95041-714 eller motsvarande Valfri leverantör av laborieutrustning	Rengöring av komponenter före en körning och allmänt bruk.
Servett för laboriebruk, luddfri	VWR, katalog nr 21905-026 eller motsvarande	Torkning av flödescellsteget och allmänt ändamål.
Reagenskvalitet NaOCl, 5 %	Sigma-Aldrich, katalognr 239305	Utföra en underhållstvätt.
Pipettspetsar, 2 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning	Pipettering för spädning och laddning av bibliotek.
Pipettspetsar, 20 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning	Pipettering för spädning och laddning av bibliotek.
Pipettspetsar, 200 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning	Pipettering för spädning och laddning av bibliotek.
Pipettspetsar, 1000 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning	Pipettering för spädning och laddning av bibliotek.
Reagens eller isopropylalkohol av spektrofotometrisk kvalitet (99 %), 100 ml flaska	Valfri leverantör av laborieutrustning	Rengör optikkomponenter regelbundet och stödjer den objektiva rengöringskassetten.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalognr P7949	Utföra en underhållstvätt.
Vatten av laboriekvalitet	Valfri leverantör av laborieutrustning	Spädning av Tween 20 och natriumhypoklorit för en underhållstvätt.

Tabell 7 Utrustning

Artikel	Källa
Frys, -25 °C till -15 °C	Valfri leverantör av laborieutrustning
Graderad cylinder, 500 ml, steril	Valfri leverantör av laborieutrustning
Ishink	Valfri leverantör av laborieutrustning
Pipett, 20 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning
Pipett, 200 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning
Pipett, 1000 µl	Valfri leverantör av laborieutrustning
Kylskåp, 2 °C till 8 °C	Valfri leverantör av laborieutrustning
Badkar, vattenbad*	Valfri leverantör av laborieutrustning

* Använd ett badkar som rymmer två reagenskassetter och lämplig vattennivå. Till exempel (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm) (24 tum × 36 tum × 10 tum).

Riktlinjer för vatten av laboriekvalitet

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

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

Bruksanvisning

Följande instruktioner är för att köra NovaSeq 6000Dx Instrument i IVD-läge med antingen S2- eller S4-satskonfigurationerna.

Skapa en sekvenskörning

Använd följande steg för att skapa Illumina Run Manager en körning i antingen IVD- eller RUO-läge. Alternativt kan du välja **Import Run** (Importera körning) på fliken Planned (Planerad) på sidan Runs (Körningar) och importera ett exempelark. Skapa nya körningar antingen på instrumentet eller genom att använda Illumina Run Manager en webbläsare på en nätverksansluten dator.

OBS! Den exakta information som krävs av varje analysapplikation skiljer sig men processen för att skapa en körning inkluderar följande steg.

1. Välj **Create Run** (Skapa körning) på fliken Planned (Planerad) på skärmen Runs (Körningar).
2. Välj ett program och välj sedan **Next** (Nästa).
3. Fortsätt genom inställningsskärmarna. Beroende på din applikation kan skärmarna som visas innehålla följande:
 - **Run Settings** (Körinställningar)—Ange körparametrar.
 - **Sample Data** (Provdatab)—Ange exempeldata manuellt eller genom att importera en CSV-fil som innehåller exempelinformation. Exempelnamn måste vara unika.
 - **Analysis settings** (Analysinställningar)—Ange inställningar för analys.
4. På Review (gransknings)skärmen granskar du körinformationen och väljer **Save** (Spara). Körningen läggs till högst upp i körningslistan på fliken Planned (Planerad).

Förbered förbrukningsmaterial

Tina SBS och klusterkassetter

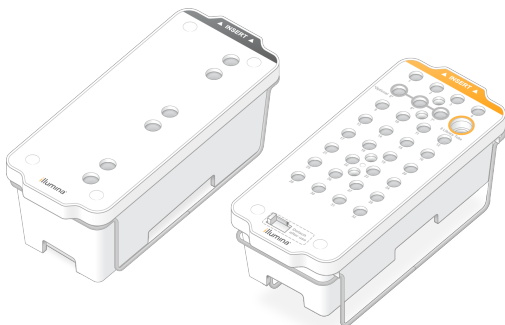


FÖRSIKTIGHET

Användning av varmt vatten för att tina reagenser kan orsaka försämrad datakvalitet eller körningsfel.

1. Om en sekvensering pågår, se till att båda sidor av instrumentet är tillgängliga när upptiningen är klar.
2. Ta bort SBS- och klusterkassetterna från -25 °C till -15 °C lagring.
3. Placera varje kassett i ett galler för upptining.
Ställen är försedda med instrumentet och förhindrar kapsejsning i vattenbadet.

Figur 4 Kassetter i tingsställ



4. Använd följande tabell för att fastställa upptiningstid.

Tina SBS och klusterkassetter i ett rumstempererat (19 °C till 25 °C) vattenbad enligt följande. Sänk kassetterna ungefär halvvägs.

Kassett	Uptiningstid
S2 SBS-kassett	4 timmar
S2-klusterkassett	Upp till 2 timmar
S4 SBS-kassett	4 timmar
S4-klusterkassett	Upp till 4 timmar

**FÖRSIKTIGHET**

Om sekvenseringen inte startar inom fyra timmar efter att reagenskassetterna har tinats kan det resultera i minskad datakvalitet.

5. Torka kassettbaserna noggrant med hushållspapper. Torka mellan brunnarna så att allt vatten tas bort.
6. Inspektera folieförseglingarna för vatten. Om vatten finns, torka av med en luddfri väv.
7. Inspektera undersidan av varje kassett för att se till att reservoarerna är fria från is, vilket indikerar att reagenserna är tinade.
8. Vänd på varje kassett 10 gånger för att blanda reagenser.

**FÖRSIKTIGHET**

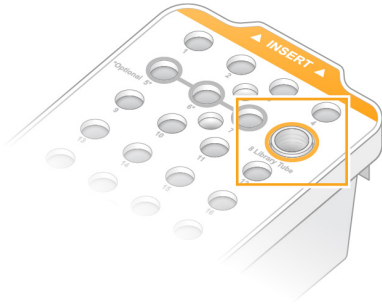
Om kassetterna inte vänds ordentligt kan det leda till försämrad datakvalitet.

9. Knacka försiktigt på botten av varje kassett på bänken för att minska luftbubblor.

Ladda biblioteksröret

1. Utan att störa biblioteket i botten, sätt in det oförslutna biblioteksröret som innehåller den denaturerade och utspädda bibliotekspoolen i **Biblioteksröret** position (nr 8) för klusterkassetten.
2. Sätt i biblioteksröret i position nr 8 på klusterkassetten.

Figur 5 Biblioteksrör utan lock laddat i position nr 8

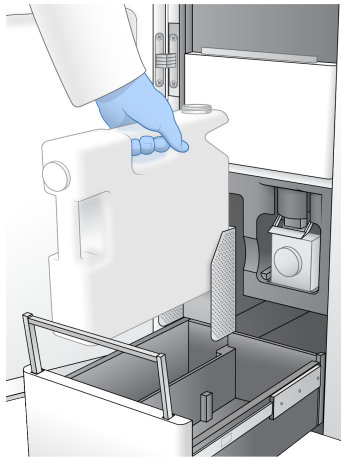


Töm använda reagensflaskor

Följ dessa instruktioner för att tömma de använda reagensflaskorna vid *varje* sekvenseringskörning. Om ditt system är konfigurerat för att dirigera använda reagenser externt samlar den lilla flaskan upp använda reagens och måste tömmas efter varje sekvenseringskörning. Den stora flaskan måste vara på plats.

1. Ta bort och töm den lilla använda reagensflaskan enligt följande.
 - a. Lyft spaken och ta bort den lilla använda reagensflaskan från alkoven. Ta tag i flaskan vid sidorna.
 - b. Ta bort det gängade locket från lockhållaren på framsidan av flaskan.
 - c. Förslut flasköppningen med locket för att förhindra spill.
 - d. Håll innehållet åtskilt från innehållet i den andra flaskan, kassera i enlighet med gällande standarder för din region.
 - e. Sätt tillbaka flaskan utan lock till alkoven och sänk sedan spaken. Förvara locket på lockhållaren.
2. Ta bort och töm den stora använda reagensflaskan enligt följande.
 - a. Använd det övre handtaget och ta bort den stora använda reagensflaskan från buffertlådans vänstra sida.
 - b. Ta bort det gängade locket från lockhållaren på framsidan av flaskan.
 - c. Förslut flasköppningen med locket för att förhindra spill.
 - d. Kassera innehållet i enlighet med gällande standarder för din region. Ta tag i båda handtagen vid tömning.
 - e. Sätt tillbaka flaskan utan lock till buffertlådan. Förvara locket på lockhållaren.

Figur 6 Återlämna den tomma flaskan



3. Använd ett nytt par puderfria handskar.



FÖRSIKTIGHET

Ta alltid på dig ett par nya handskar efter att ha hanterat den använda reagensflaskan.

4. Stäng buffertlådan och stäng sedan vätskefackets luckor.



FÖRSIKTIGHET

Om de använda reagensflaskorna inte töms kan det resultera i en avslutad körning och översvämning, vilket skadar instrumentet och utgör en säkerhetsrisk.

Förbered flödescellen

1. Ta bort ett nytt förpackat flödescellpaket från 2°C till 8°C lagring.
2. Ställ det förseglade flödescellpaketet åt sidan vid omgivningstemperatur (19 °C till 25 °C) i 10–15 minuter. Använd flödescellen inom 12 timmar efter att den tagits ut ur förpackningen.

Ladda förbrukningsmaterial

Följ dessa instruktioner för att starta körinställningar och ladda förbrukningsmaterial.

1. Från huvudmenyn, välj **Sequence** (Sekvens) och välj sedan en enkel- eller dubbelflödescellkörning enligt följande.
 - **A+B**—Ställ in en dubbelflödescellkörning.
 - **A**—Sätt upp en enda flödescellkörning på sida A.
 - **B**—Sätt upp en enda flödescellkörning på sida B.Systemet initierar körinställningar, med början med att ladda flödescellen.
2. Välj **OK** för att bekräfta varningen och öppna flödescellens lucka.

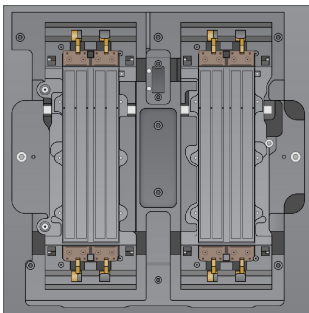
**FÖRSIKTIGHET**

Håll ytan ren under sekvenskörningen och undvik att luta dig mot instrumentet. Tryck mot flödescellsdörren kan få den att öppnas, vilket stoppar körningen. Stoppade körningar kan inte återupptas.

Ladda flödescellen

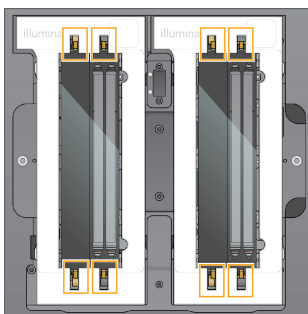
1. Om sådan finns, ta bort flödescellen från föregående körning.
2. Om partiklar är synliga på flödescellssteget, rengör hela objektglaset, inklusive vätskegränsytan och glasytan på det optiska inriktningsmålet, med en alkoholservett. Torka med ett luddfritt papper.

Figur 7 Flödescellens plattform



3. Ta bort flödescellen från förpackningen enligt följande.
 - a. Ta på dig ett nytt par puderfria handskar för att undvika att förorena flödescellens glasyta.
 - b. Med förpackningen över en plan yta, dra loss folien från hörnfliken.
 - c. Ta bort den genomskinliga plasthållaren som täcker flödescellen.
 - d. Ta bort flödescellen från förpackningen. Ta tag i flödescellen i sidorna för att undvika att vidröra glaset eller undersidans packningar.
 - e. Om partiklar är synliga på någon av glasytorna, rengör den tillämpliga ytan med en luddfri alkoholservett och torka med en labbservett med låg luddighet.
 - f. Kassera förpackningen på lämpligt sätt.
4. Rikta in flödescellen över de fyra upphöjda klämmorna och placera den på flödescellssteget.

Figur 8 Laddade flödesceller inriktade över klämmor



5. Välj **Close Flow Cell Door** (Stäng flödescelldörren).

Flödescelldörren stängs, sensorerna och RFID kontrolleras och flödescellens ID visas på skärmen.

Ladda SBS- och klusterkassetter

1. Öppna vätskefackets luckor och öppna sedan reagenskylmaskinens lucka.
2. Ta bort de använda SBS- och klusterkassetterna, om de är kvar från en tidigare körning.
De använda kassetterna har genomborrade folieförslutningar.
3. Kassera oanvänt innehåll i enlighet med tillämpliga standarder.
För säker kassering av position nr 30 för klusterkassetten, se [Lossa position nr 30 på sidan 20](#).
4. Ladda de förberedda kassetterna i reagenskylådan enligt följande, så att infogningsetiketterna är vända mot baksidan av instrumentet.
 - Placera SBS-kassetten (grå etikett) till vänster.
 - Placera klusterkassetten (orange etikett) som innehåller biblioteksroret utan lock i rätt position.

Figur 9 Laddade reagenskassetter

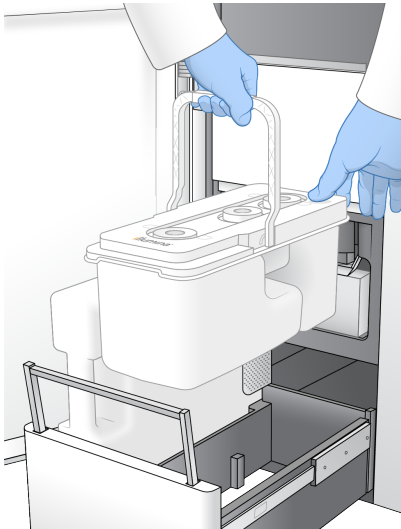


5. Skjut in lådan i kylaren och stäng sedan luckan till reagenskylmaskinen.
Sensorerna och RFID kontrolleras. ID för biblioteksroret och de två kassetterna visas på skärmen.

Ladda buffertkassetten

1. Dra i metallhandtaget för att öppna buffertlådan.
2. Ta bort den använda buffertkassetten från buffertlådans högra sida.
Den använda buffertkassetten har genomborrade folieförslutningar.
3. Placera en ny buffertkassett i buffertlådan så att etiketten Illumina är vänd mot lådans framsida. Rikta in kassetten med de upphöjda styrningarna på lådans golv och sidor.
När den är korrekt laddad är buffertkassetten jämnt placerad och lådan kan stängas.

Figur 10 Ladda buffertkassetten



- Om båda använda reagensflaskorna har tömts, markera kryssrutan och bekräfta att båda använda reagensflaskorna är tomma.

OBS! Om de använda reagensflaskorna inte töms kan det resultera i en avslutad körning och översvämning, vilket skadar instrumentet och utgör en säkerhetsrisk.

- När förbrukningsmaterial har lagts till, välj **Run Selection** (Kör val) för att fortsätta.

Välj och starta Kör

Instrumentet skannar biblioteksrets ID och söker efter en matchande planerad körning.

- Om en planerad körning som matchar biblioteksrets ID hittas för varje sida som används, hoppas körningen över. Välj **Review** (Granska) för att fortsätta.
- Om det inte finns någon matchande körning för en eller någon av sidorna, välj **Run Selection** (Kör val) och välj sedan en eller flera planerade körningar.
Samma planerade körning kan inte väljas på båda sidor.
- När en eller flera körningar är valda, välj **Pre-Run Checks** (Kontroller före körning).
- Vänta cirka 5 minuter tills förkörningskontrollen är klar.
Om kontrollerna slutförs korrekt startar körningen automatiskt.

OBS! För att undvika att hårddisken överfylls, kopiera inte några data till C:\ efter att körningen har startat.

Fel vid en kontroll före en körning

1. Om förkörningskontroller misslyckas på grund av ett sensorfel, såsom flödescell som inte detekteras, måste du avsluta och starta om arbetsflödet.
2. För andra förkörningskontrollfel, välj **Retry** (Försök igen) för att starta om den misslyckade kontrollen eller **Retry All** (Försök alla igen) för att starta om alla kontroller.
Fel kräver lösning innan körningen kan starta.
3. Välj **Error** (Felikonen) för att se feldetaljer.
4. Om inriktningskontrollen misslyckas, åtgärda felet enligt följande.
 - a. Välj **Reload** (Ladda om) och välj sedan **OK** för att återgå till skärmen Load (Ladda).
 - b. Ta bort alla föremål från toppen av instrumentet och välj sedan **OK**. Flödescelldörren öppnas.
 - c. Ladda om flödescellen och välj sedan **Run Setup** (Kör installationsprogrammet).
 - d. Fortsätt genom varje skärm för att läsa om varje RFID och återgå till skärmen Pre-Run Checks (Kontroller före körning).
 - e. Gör om kontrollen.

Övervaka körningsförloppet






Följande detaljer visas på skärmen Sequencing (Sekvensering) medan körningen pågår. Skärmen Sequencing (Sekvensering) nås via huvudmenyn.

- **Status för enskilda körsteg**
- **Time to completion** (Tid till slutförande)— datum och tid för körningens slutförande (åååå-mm-dd hh:mm).
- **Run progress** (Kör framsteg)—Det aktuella körsteget. Storleken på förloppsindikatorn är inte proportionell mot körhastigheten för varje steg.
- **Q-scores** (Kvalitetsresultat)—Visar fördelningen av kvalitetsresultat (Q-resultat).
- **Intensity** (Intensitet)—Värdet av klusterintensiteter från 90^{te} percentil för varje bricka. Plottfärger indikerar de röda och gröna kanalerna.
- **Clusters passing filter (%)** (Klusters passerfilter [%])—Visar procentandelen kluster som passerar filtret.
- **Projected Total Yield (GB)** (Prognostiserat totalutbyte [GB])—Det prognostiserade utbytet för flödescellkörningen. Om måtten per fil väljs (H) är siffrorna som visas den aktuella avkastningen per körfält och uppdatering per cykel under hela körningen.
- **Q30**—Andel basbestämning för körningen med en Q-resultat på ≥ 30 .

Statusikoner

En statusikon på NVOS gränssnittet indikerar körstatus. En siffra på ikonen indikerar antalet tillstånd för en status.

När en körstatus ändras blinkar ikonen. Välj ikonen för att se en beskrivning av tillståndet. Välj **Acknowledge** (Bekräfta) för att ta bort meddelandet och **Close** (Stäng) för att stänga dialogrutan.

Statusikon	Statusnamn	Beskrivning
	Status okej	Systemet är normalt.
	Bearbetar	Systemet bearbetar.
	Varning	En varning har inträffat och uppmärksamhet krävs. Varningar stoppar inte en körning eller behöver åtgärdas innan körningen kan återupptas.
	Fel	Ett fel har inträffat. Fel måste åtgärdas innan körningen kan återupptas.
	Information	Ett icke-kritiskt meddelande är tillgängligt.

Körningsmått

Programvaran visar mätvärden som genererats under körningen. Mätvärden visas i form av plotter, grafer och tabeller baserade på data som genereras av RTA3 och skrivits till InterOp-filer.

Klustring tar cirka 2 timmar, sedan börjar sekvenseringen med cykel 1. Mätvärden uppdateras när sekvenseringen fortskrider. Klusters passerfilter, avkastning och kvalitetspoäng är tillgängliga efter cykel 26. Före cykel 26 är inga värden ifyllda och betecknas som ej tillämpliga.

Efter sekvensering

Följande avsnitt ger instruktioner om steg som händer efter att sekvenseringen har slutförts.

Automatisk tvätt efter körning

När sekvenseringen är klar initierar programvaran en automatisk efterkörningstvätt som tar cirka 80 minuter. Systemet pumpar 0,24 % natriumhypoklorit (NaOCl) från position nr 17 och späder ut det till 0,12 %. 0,12 % NaOCl pumpas till ExAmp-reagens- och bibliotekspositionerna, genom flödescellen och sedan till de använda reagensflaskorna. Tvätten spolrar mallen från systemet för att förhindra korskontaminering.

När tvätten är klar placeras systemet i ett säkert tillstånd och hemknappen blir aktiv. Lämna förbrukningsmaterial på plats tills nästa körning. Efter tvätten stannar sippers i SBS- och klusterkassetterna för att förhindra att luft kommer in i systemet. Sippers i buffertkassetten höjs så att de använda reagensflaskorna kan tömmas. Tvättbuffert pumpas sedan genom alla ledningar för att rensa bort NaOCl och reagens från systemet.

OBS! Om ett fel uppstår under en automatisk efterkörningstvätt, och efterkörningstvätten är ofullständig, krävs en underhållstvätt.

Lossa position nr 30

Reservoaren på position nr 30 i klusterkassetten innehåller formamid. Den tas bort från den använda klusterkassetten och kasseras separat.



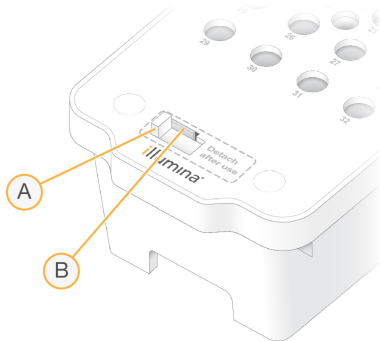
FÖRSIKTIGHET

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

1. Med handskar på, skjut den vita plastfliken märkt **Detach after use** (Ta loss efter användning) till höger.
2. Placera en hand eller en fast yta under behållaren och tryck den genomskinliga plastfliken mot Illumina etiketten för att frigöra behållaren från under klusterkassetten.

OBS! Undvik att stapla klusterkassetter vid förvaring. Stapling kan orsaka oavsiktlig lossning av behållaren.

Figur 11 Avtagbar position nr 30



- A. Vit plastflik att lossa
- B. Genomskinlig plastflik för att frigöra

3. Kassera behållaren i enlighet med tillämpliga standarder.

Utdata från sekvensering

Under sekvenseringen överförs data automatiskt från NovaSeq 6000Dx Instrument till Illumina DRAGEN Server. När den primära analysen är klar och överföringen av data är klar, kan den sekundära analysen på Illumina DRAGEN Server börja automatiskt med hjälp av analysalternativen som definieras av den applikation som valts i Illumina Run Manager. Resultaten som produceras beror på de alternativ som valts under körningsinstallationen. För att se resultat från en körning, välj önskat körningsnamn på fliken Completed (Slutfört) på skärmen Runs (Körningar). Du kan också hitta utdatafiler på den plats som anges på skärmen Instrument Settings (Instrumentinställningar).

Realtidsanalys

NovaSeq 6000Dx Instrument kör RTA3, en implementation av Realtidsanalys programvara, på instrumentet Compute Engine (CE). RTA3 extraherar intensiteter från bilder som tas emot från kameran, utför basbestämning, tilldelar ett kvalitetspoäng till basbestämning, anpassar till PhiX och rapporterar data i InterOp-filer.

För att optimera bearbetningstiden lagrar RTA3 information i minnet. Om RTA3 avslutas återupptas inte bearbetningen och alla kördata som bearbetas i minnet går förlorade.

RTA3 Indata

RTA3 kräver bilder som finns i det lokala systemets minne för bearbetning. RTA3 tar emot körinformation och kommandon från NVOS.

RTA3 Utdata

Bilder för varje färgkanal skickas i minnet till RTA3 som brickor. Från dessa bilder genererar RTA3 en uppsättning kvalitetsbetygade basbestämningsfiler och filterfiler. Alla annan utdata är stödutdatafiler.

Filtyp	Beskrivning
Basbestämningsfiler	Varje platta som analyseras ingår i en sammanslagen basbestämningsfil (*.cbcl). Plattor från samma körfält och yta samlas i en CBCL-fil för varje körfält och yta.
Filterfiler	Varje platta genererar en filterfil (*.filter) som anger om ett kluster passerar filtret.

RTA3 tillhandahåller realtidsmått för körkvalitet lagrade som InterOp-filer, som är en binär utdata som innehåller mätvärden för brickor, cykel och läsnivå.

Felhantering

RTA3 skapar loggfiler och skriver dem till mappen Loggar. Fel registreras i en textfil i filformatet *.log.

Följande loggfiler överförs till den slutgiltiga utdatadestinationen när bearbetningen har slutförts:

- `info_00000.log` sammanfattar viktiga körningshändelser.
- `error_00000.log` listar fel som uppstod under en körning.
- `warning_00000.log` listar varningar som inträffade under en körning.

Flödescellsplattor

Plattor är små avbildningsområden på flödescellen. Kameran tar en bild av varje sträng, som programvaran delar upp i brickor för RTA3-bearbetning. Det totala antalet brickor beror på hur många banor, strängar och ytor som avbildas på flödescellen.

- S2-flödesceller har totalt 1 408 brickor.
- S4-flödesceller har totalt 3 744 brickor.

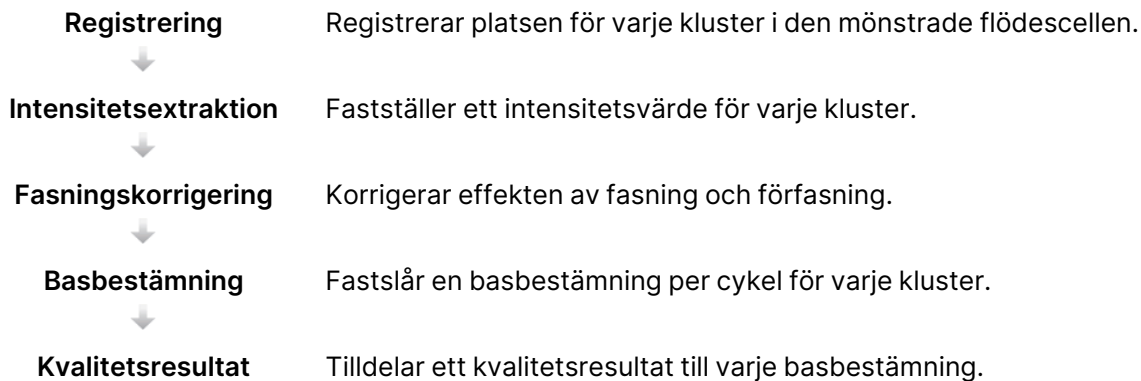
Flödescellskomponent	S2	S4	Beskrivning
Spår	2	4	En bana är en fysisk kanal med in- och utgångsportar.
Ytor	2	2	S2- och S4-flödescellerna avbildas på två ytor: den övre och den undre. En plattas övre yta avbildas först.
Strängar per spår	4	6	En sträng är en kolumn i en flödescellfil som kameran fångar som en skannad bild.
Plattor per sträng	88	78	En platta är en del av en sträng och visar ett avbildat område på flödescellen.

Flödescellskomponent	S2	S4	Beskrivning
Totalt antal genererade plattor	1408	3744	Spår × ytor × strängar × plattor per sträng är lika med det totala antalet plattor.

Bricknamnet är ett femsiffrigt nummer som representerar brickpositionen på flödescellen. Till exempel indikerar bricknamn 1_1205 bana 1, toppyta, sträng 2, bricka 5.

- Den första siffran är körfältsnumret:
 - 1 eller 2 för en S2-flödescell.
 - 1, 2, 3 eller 4 för en S4-flödescell.
- Den andra siffran representerar ytan: 1 för topp eller 2 för botten.
- Den tredje siffran representerar strängnumret:
 - 1, 2, 3 eller 4 för en S2-flödescell.
 - 1, 2, 3, 4, 5 eller 6 för en S4-flödescell.
- De två sista siffrorna representerar plattnumret. Numreringen börjar med 01 vid utloppsändan av flödescellen genom 88 eller 78 vid inloppsändan.
 - 01 till 88 för en S2-flödescell.
 - 01 till 78 för en S4-flödescell.

Arbetsflöde för realtidsanalys



Registrering

Registrering anpassar en bild till den roterade fyrkantiga samlingen nanobrunnar på den möntrade flödescellen. På grund av det ordnade arrangemanget av nanobrunnar är X och Y koordinaterna för varje kluster i en bricka förutbestämda. Klusterpositioner skrivs till en klusterplatsfil (s.locs) för varje körning.

Om registreringen misslyckas för bilder i en cykel genereras inga basbestämningar för den plattan i den cykeln.

Intensitetsextraktion

Efter registreringen beräknar intensitetsextraktionen ett intensitetsvärde för varje nanobrunn i en specifik bild. Om registreringen misslyckades kan inte intensiteten för den plattan extraheras.

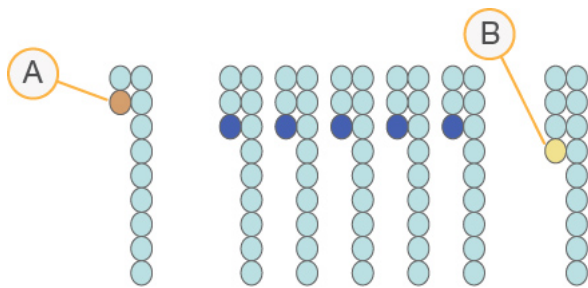
Fasningskorrigering

Under sekvenseringsreaktionen förlängs varje DNA-sträng i ett kluster med en bas per cykel. Fasning och förfasning inträffar när en sträng hamnar ur fas med den aktuella inkorporeringscykeln.

Fasning sker när en basinkorporering hamnar på efterkälken.

Förfasning sker när en basinkorporering hoppar framåt.

Figur 12 Fasning och förfasning



- A. Avläsning med en bas som är ett exempel på fasning
- B. Avläsning med en bas som är ett exempel på förfasning.

RTA3 korrigerar effekterna av fasning och förfasning, vilket maximerar datakvaliteten vid varje cykel under körningen.

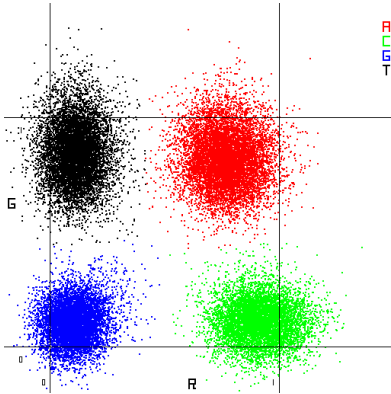
Basbestämning

Vid basbestämning bestäms en bas (A, C, G eller T) för alla kluster på en specifik platta i en specifik cykel. NovaSeq 6000Dx Instrument använder tvåkanalssekvensering, vilket kräver endast två bilder för att koda data för fyra DNA baser, en bild från den gröna kanalen och en från den röda kanalen.

En saknad basbestämning identifieras som N. En saknad basbestämning inträffar när ett kluster inte passerar filtret, registrering misslyckas eller ett kluster flyttas från bilden.

Intensiteter för varje kluster extraheras från de röda och gröna bilderna och jämförs mot varandra, vilket resulterar i fyra distinkta populationer. Varje population motsvarar en bas. Basbestämning bestämmer vilken population varje kluster tillhör.

Figur 13 Visualisering av klusterintensiteter



Tabell 8 Basbestämning i tvåkanalssekvensering

Bas	Röd kanal	Grön kanal	Resultat
A	1 (på)	1 (på)	Kluster som visar intensitet i både röda och gröna kanaler.
C	1 (på)	0 (av)	Kluster som endast visar intensitet i den röda kanalen.
G	0 (av)	0 (av)	Kluster som inte visar någon intensitet vid en känd klusterplats.
T	0 (av)	1 (på)	Kluster som endast visar intensitet i den gröna kanalen.

Klusters passerfilter

Under körningen filtrerar RTA3 rådata för att ta bort läsningar som inte uppfyller datakvalitetströskeln. Överlappande kluster eller kluster av låg kvalitet tas bort.

För tvåkanalsanalys använder RTA3 ett populationsbaserat system för att bestämma kyskheten (intensitetsrenhetsmätning) för en basbestämning. Kluster passerar filtret (PF) när inte mer än en basbestämning har en renhet under ett angivet tröskelvärde under de första 25 cyklerna. När den ingår utförs PhiX-inpassning under cykel 26 på en underuppsättning av plattor för kluster som passerade filtret. Kluster som inte passerar filtret har inte basbestämts och är inte inpassade.

Kvalitetsresultat

Ett kvalitetsresultat, eller Q-resultat, mäter sannolikheten för en felaktig basbestämning. Hög Q-resultat indikerar att en basbestämning är av bra kvalitet och sannolikt är korrekt. Efter att Q-resultaten har bestämts registreras resultaten i CBCL-filer.

Q-resultat är ett praktiskt sätt att mäta sannolikheten för små fel. Kvalitetspoäng representeras som Q(X), där X är poängen. I nedanstående tabell visas relationen mellan ett kvalitetsresultat och sannolikheten för fel.

Q-resultat Q(X)	Felsannolikhet
Q40	0,0001 (1 på 10 000)
Q30	0,001 (1 på 1 000)
Q20	0,01 (1 på 100)
Q10	0,1 (1 på 10)

Kvalitetspoäng och rapportering

Kvalitetspoäng beräknar en uppsättning prediktorer för varje basbestämning och använder sedan prediktorvärdena för att slå upp Q-resultaten i en kvalitetstabell. Kvalitetstabeller skapas för att ge optimalt noggranna kvalitetsprognoser för körningar som skapas av en specifik konfiguration av sekvenseringsplattform och uppsättning av kemikalier.

Kvalitetsresultat baseras på en anpassad version av Phred-algoritmen.

För att generera Q-tabellen för NovaSeq 6000Dx Instrument, bestämdes tre grupper av basbestämningar, baserat på klustringen av dessa specifika prediktiva funktioner. Efter gruppering av basbestämningarna beräknades den genomsnittliga felfrekvensen empiriskt för var och en av de tre grupperna och motsvarande Q-resultat registrerades i Q-tabellen tillsammans med de prediktiva funktionerna som korrelerar till den gruppen. Som sådan är endast tre Q-resultat möjliga med RTA3 och dessa Q-resultat representerar den genomsnittliga felfrekvensen för gruppen. Sammantaget resulterar det i förenklade men ändå mycket noggranna kvalitetsresultat. De tre grupperna i kvalitetstabellen motsvarar marginell (< Q15), medium (~Q20) och högkvalitativa (> Q30) basbestämningar tilldelas de specifika poängen 12, 26 respektive 34. Dessutom tilldelas det ogiltiga resultatet 2 alla no-calls. Den här rapporteringsmodellen för Q-resultat minskar kraven på lagringsutrymme och bandbredd utan att påverka noggrannhet eller prestanda.

Figur 14 Förenklad Q-poäng med RTA3



Utdatafiler från sekvensering

Filtyp	Filbeskrivning, plats och namn
Basbestämningsfiler	Varje kluster som analyseras ingår i en basbestämningsfil, samlad i en fil per cykel, körfält och yta. Den aggregerade filen innehåller basbestämning och kodade kvalitetspoäng för varje kluster. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, till exempel L001_1.cbcl
Klusterplaceringsfiler	För varje flödescell innehåller en binär klusterplatsfil XY koordinaterna för kluster i en bricka. En sexkantig layout som matchar flödescellens nanobrunnslayout fördefinierar koordinaterna. Data\Intensities s_[lane].locs
Filterfiler	Filterfilen anger om ett kluster passerar filtret. Filterfiler genereras under cykel 26 med data från de föregående 25 cyklerna. En filterfil genereras för varje platta. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Fil med körningsinformation	Listar körningsnamnet, antalet cykler i varje avläsning, om avläsningen är en indexavläsning och antalet strängar och plattor på flödescellen. Körningsinformationsfilen skapas i början av körningen. [Root folder], RunInfo.xml
Miniatyrfiler	Miniatyrbilder för den första cykeln av varje sekvensläsning. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]—Filer lagras i en undermapp för varje cykel. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg—Miniatyrbilden inkluderar bricknummer.

Mapstruktur för sekvenseringsutdata


NVOS genererar utdatamappens namn automatiskt.

 **Config** (Konfig)—Konfigurationsinställningar för körningen.


 **Logs** (Loggar)—Loggfiler som beskriver operativa steg, instrumentanalys och RTA3 händelser.


 SampleSheet.csv—Provark eller annan bifogad fil, om tillämpligt.


 **Data**

 **Intensities** (Intensiteter)

 **BaseCalls** (Basbestämningar)

 **L00[X]**—Basbestämningsfiler (*.cbcl) samlade i en fil per körfält, yta och cykel.

 s.locs—Klusterplatsfilen för körningen.

 **InterOp**—Binära filer.

 **Recipe** (Recept)—Körningsspecifik receptfil.

Thumbnail Images (Miniatyrbilder)—Miniatyrbilder för var 10^e bricka.

LIMS—Kör installationsfilen (*.json), om tillämpligt.

Audit (Granska)

AuditInfo.xml

RTA3.cfg

RunInfo.xml

RunParameters.xml

RTAComplete.txt

CopyComplete.txt

SequenceComplete.txt

IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

Manifest.tsv

Varningar och försiktighetsåtgärder



FÖRSIKTIGHET

Federal lag begränsar denna enhet till försäljning av eller på order av en läkare eller annan läkare som är licensierad enligt lagen i den stat där de utövar, att använda eller beställa användning av enheten.

- **Vissa komponenter i reagenser som tillhandahålls av Illumina för användning tillsammans med NovaSeq 6000Dx Instrument kan innehålla 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.** För ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet, se säkerhetsdatabladerna (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- Underlåtenhet att följa de förfaranden som beskrivs kan resultera i felaktiga resultat eller signifikant försämra provkvaliteten.
- Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenssatser. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenssatser.
- God laboratoriesed och laboratoriehygien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagens, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontaminering kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
- Områdena som används före och efter amplifiering ska ha egen utrustning och eget förbrukningsmaterial (t.ex. pipetter, pipettspetsar, värmeblock, vortexblandare och centrifuger) för att undvika kontaminering.

- Index till provparning kräver att indexplattans layout matchar exakt. DNA Prep with Enrichment Application fyller automatiskt i indexprimrarna som är associerade med provnamnen när de anges under körningsinställningen. Användaren rekommenderas att verifiera indexprimrarna associerade med proverna innan sekvenseringskörningen påbörjas. Bristande överensstämmelse mellan proverna och plattlayout leder till förlust av positiv providentifikation och felaktig rapportering av resultat.
- Installation av användarens antivirusprogram rekommenderas starkt för att skydda datorn mot virus.
- Använd inte NovaSeq 6000Dx med någon av panelerna borttagen. Om instrumentet används när en eller flera paneler är borttagna finns det risk för potentiell exponering för systemspänning och likspänning.
- Rör inte vid flödescellsplattformen i flödescellsfacket. Värmaren i det här facket har en temperatur mellan 22 °C och 95 °C och kan orsaka brännskador.
- Instrumentet väger cirka 1 059 lbs. och kan orsaka allvarliga skador om det tappas eller hanteras fel.

Prestandaegenskaper

Prestandaegenskaper för instrumentet NovaSeq 6000Dx har fastställts med hjälp av Illumina DNA Prep with Enrichment Dx för biblioteksberedning, NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) för sekvensering, och applikationen DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx för sekundär analys inklusive köns-cell- och somatisk variantdetektering. Studierna omfattade provindexering, provöverföring, DNA-inmatning, analytisk sensitivitet (gräns för blankprov/detekteringsgräns), noggrannhet, precision, metodjämförelse och reproducerbarhet. Se *Bipacksedel för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* för prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer, såsom extraktionsmetoder eller störande ämnen.

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 procentöverensstämmelse (NPA) beräknas som andelen loci som klassificerats som vildtyp med en referensmetod som rapporteras korrekt av analysen.
 - $(\text{Ant. vildtypsloci rapporteras korrekt av analysen}) / (\text{totalt antal vildtypsloci})$Vildtypsställen som rapporterats av analysen som överensstämmer med referensmetoden är sanna negativa (TN). 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.
 - $$\frac{((\text{Ant. variantloci korrekt rapporterad av analysen}) + (\text{ant. vildtypsloci korrekt rapporterad av analysen}))}{((\text{totalt antal variantloci}) + (\text{totalt antal vildtypsloci}))}$$
4. Beräkningarna av PPA, NPA och OPA innefattar inte saknade bestämningar (variant- eller referensloci som inte uppfyller kriterierna i ett eller flera kvalitetsfilter).
5. Positiva bestämningar i procent (PPC) är antalet observationer med den upptäckta varianten dividerat med det totala antalet testade observationer exklusive eventuella ogiltiga observationer eller de som filterats som lågt djup.
6. Negativa bestämningar i procent (PNC) beräknas som antalet observationer med godkänd referens som resultatet vid en position dividerat med det totala antalet testade observationer exklusive eventuella ogiltiga observationer eller de som filterats som lågt djup.
7. Andelen bestämbara autosomer beräknas som procentandelen av icke-N-referenspositioner i målregioner i autosomala kromosomer med passerande genotypbestämning.

Provindexering

Provindexering som läggs till under biblioteksberedning ger varje prov-DNA en unik sekvens. Med de unika sekvenserna kan flera prover poolas i en och samma sekvenseringskörning. Provindexering används för både könscell och somatiska arbetsflöden. Syftet med denna studie var att fastställa det minsta (12) och maximala (192) antalet prover som kan bearbetas i en enda sekvensering som körs av NovaSeq 6000Dx Instrument. Tolv unika platinagenom DNA-prover (NA12877–NA12888) testades med minst 12 olika indexerande primerkombinationer per prov. Provbibliotek bereddes med hjälp av en representativ analys utformad för att fråga en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer. Provresultat från fyra sekvenseringskörningar med Germline FASTQ- och VCF-genereringsarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen jämfördes med Platinum Genomes version 2016-1.0.

För den första uppsättningen av körningar sekvenserades 192 unikt indexerade provbibliotek i två sekvenseringskörningar, en vardera med S2- och S4-reagens, för att verifiera både det maximala antalet index som stöds och analysens förmåga att konsekvent göra en genotypningsbestämning för ett givet prov över olika indexerande primerkombinationer. För den andra uppsättningen av körningar sekvenserades 12 unikt indexerade provbibliotek i två sekvenseringskörningar, en vardera med S2- och S4-reagens, för att verifiera det minsta antalet index som stöds.

För 192-indexkörningarna varierade PPA för SNV från 99,7 % till 100 %, PPA för insertioner var 100 %, PPA för deletioner varierade från 96,7 % till 100 % och NPA var 100 %. För 12-indexkörningarna varierade PPA för SNV från 99,7 % till 100 %, PPA för insertioner varierade från 89,6 % till 100 %, PPA för deletioner varierade från 94,6 % till 100 % och NPA var 100 %.

Provöverföring

Det NovaSeq 6000Dx Instrument möjliggör sekvensering av flera prover plus kontroller i en enda sekvenseringskörning. En studie genomfördes för att utvärdera omfattningen av provöverföring inom en sekvenseringskörning (inom körning) och mellan sekvenseringskörningar (mellan körningar). Tolv platinagenom-DNA-prover, sex män och sex kvinnor, testades med en representativ analys som utformats för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer, inklusive båda könskromosomerna. Bibliotek sekvenserades NovaSeq 6000Dx Instrument med hjälp av Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet i DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen. Överföring av manliga prover till kvinnliga prover observerades genom närvaron av Y-kromosommålväsningar i kvinnliga prover.

Överföring inom körning kan introduceras under klustergenerering, indexbasbestämning och provdemultiplexering. För testning av provöverföring inom en sekvenseringskörning sekvenserades en bibliotekspool bestående av minst tolv replikat av varje unikt manligt och kvinnligt prov plus två inga mallkontroller, för totalt 192 unikt indexerade bibliotek, i två NovaSeq 6000Dx Instrument sekvenseringskörningar, en vardera med S2- och S4-reagens. Provöverföring inom körningen utvärderades genom att jämföra Y-kromosommåltäckningen för varje kvinnligt replikat med den genomsnittliga Y-kromosommåltäckningen för alla manliga replikat i poolen. Den 95:e percentilen av observerad överföring inom körning var 0,0090 % och 0,041 % för S2- respektive S4-reagens.

För testning av provöverföring mellan körningar bereddes två bibliotekspooler och sekvenserades i följd på en NovaSeq 6000Dx Instrument, med sida A med S4-reagens och sida B med S2-reagens. Den första poolen innehöll minst tolv replikat av sex unika kvinnliga prov plus två inga mallkontroller, för totalt 96 unikt indexerade bibliotek. Den andra poolen innehöll minst tolv replikat av sex unika manliga prov plus två inga mallkontroller, för totalt 96 unikt indexerade bibliotek. 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. Provöverföring mellan körningar bedömdes per reagenstyp, S2 och S4, genom att jämföra Y-kromosommåltäckningen mellan motsvarande replikat av upprepad körning av kvinnlig pool och körning av manlig pool. Den 95:e percentilen av observerad överföring inom körning var 0,0089 % och 0,012 % för S2- respektive S4-reagens.

DNA-inmatning

Blod (köns-cell/Germline)

Blodets DNA-inmatningsintervall för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsen med DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen upprättades för NovaSeq 6000Dx. Detta utvärderades genom att utföra en serieutspädningsstudie med åtta platinagenom-DNA-prover (NA12877 – NA12884) med en representativ analys utformad för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer. Bibliotek sekvenserades på ett NovaSeq 6000Dx Instrument med en lot vardera av NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler).

Sju prover testades i duplikat vid sex DNA-inmatningsnivåer från 1000 ng till 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng och 10 ng). Ett åttonde prov (NA12884) testades som ett enda replikat vid 10 ng ingång och i duplikat för alla andra inmatningsnivåer. För bestämning av noggrannhet jämfördes provgenotyper med Platinum Genomes version 2016-1.0. Resultaten fastställdes för varje inmatningsnivå. PPA för varje varianttyp (SNV, insertioner och deletioner) presenteras i [PPA-resultat för varje blod-DNA-inmatning efter varianttyp på sidan 32](#). NPA presenteras i [NPA för varje DNA-inmatning på sidan 32](#). Alla inmatningsnivåer hade liknande noggrannhet. Den rekommenderade blod-DNA-inmatningen för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx är 50-1 000 ng med 1 000 ng och 10 ng som ger en övre och nedre gräns för att uppfylla prestandaegenskaper vid sekvensering på NovaSeq 6000Dx.

Tabell 9 PPA-resultat för varje blod-DNA-inmatning efter varianttyp

DNA-inmatning (ng)	Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1 000		74112	73	7	99,9	
10	Insertion	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50		2914	8	6	99,7	
100		2917	6	5	99,8	
250		2928	0	0	100	
1 000		2921	5	2	99,8	
10	Deletion	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	>99,9	
250		2201	0	39	100	
1 000		2195	2	43	99,9	

Tabell 10 NPA för varje DNA-inmatning

DNA-inmatning (ng)	TN	FP	Saknade referensbestämningar	NPA (%)
10	115449045	384	285751	>99,9
25	123012157	415	438153	>99,9

DNA-inmatning (ng)	TN	FP	Saknade referensbestämningar	NPA (%)
50	122985299	369	465043	>99,9
100	122976660	321	473730	>99,9
250	122971099	331	479289	>99,9
1 000	122978527	324	471882	>99,9

FFPE (Somatic)

Det formalinfixerade paraffininbäddade (FFPE) DNA-inmatningsintervallet för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsen med DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen fastställdes för NovaSeq 6000Dx. Detta utvärderades genom att utföra en serieutspädningsstudie med två platinagenomprover med en representativ analys som utformats för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer. Bibliotek sekvenserades på ett NovaSeq 6000Dx Instrument med en lot vardera av NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler).

Prov GM12877 DNA späddes med prov GM12878 DNA för att skapa GM12877-13 med unika GM12877 heterozygota och homozygota varianter vid frekvenser nära 6,5 % respektive 13 %. Outspädd GM12877 testades också. GM12877-13 was tested in duplicate at four DNA input levels ranging from 1 000 ng to 25 ng (1 000 ng, 250 ng, 50 ng and 25 ng). GM12877 testades som en enda replikat vid 250 ng och i duplikat för alla andra ingångsnivåer. För bestämning av noggrannhet jämfördes provvariantbestämning med Platinum Genomes version 2016-1.0. Resultaten fastställdes för varje inmatningsnivå. PPA för varje varianttyp (SNV, insertioner och deletioner) presenteras i [PPA-resultat för varje FFPE-DNA-ingång efter varianttyp och mål-VAF på sidan 33](#). NPA presenteras i [NPA för varje FFPE DNA-ingång på sidan 34](#). Alla inmatningsnivåer hade liknande noggrannhet. För FFPE-prover med ett ΔCq -värde på ≤ 5 är den rekommenderade DNA-inmatningen 50–1 000 ng för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsen med 1 000 ng och 25 ng, vilket ger en övre och nedre gräns för att uppfylla prestandaegenskaper vid sekvensering på NovaSeq 6000Dx.

Tabell 11 PPA-resultat för varje FFPE-DNA-ingång efter varianttyp och mål-VAF

DNA-inmatning (ng)	Varianttyp	Förväntade varianter	Målspädningens VAF								
			0,065				0,13				
			TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1 000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	Insertion	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1 000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100

Målspädningens VAF											
0,065						0,13					
DNA-inmatning (ng)	Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA (%)
25	Deletion	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1 000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tabell 12 NPA för varje FFPE DNA-ingång

DNA-inmatning (ng)	Förväntad vildtyp	TN	FP	Saknade referensbestämningar	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	>99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	>99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	>99,9
1 000	29030903	29030596	307	1822781	>99,9

Analytisk känslighet (gräns för blank [Limit of Blank, LoB] och detekteringsgräns [Limit of Detection, LoD])

Denna studie genomfördes för att utvärdera Limit of Blank (LoB) och Limit of Detection (LoD) för analysarbetsflödet för Somatic FASTQ och VCF-generering av DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen på NovaSeq 6000Dx Instrument. Studien utfördes med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer. Platinum Genome-cellinjerna GM12878 och GM12877 formalinfixerades och bäddades in i paraffin, följt av DNA-extraktion. Spädningar av GM12877 i GM12878 bereddes för att göra prover bestående av 0 %, 4 %, 6,5 % och 13 % GM12877 i volym, så att variantfrekvenserna för 489 unika GM12877-varianter (454 SNV, 17 insertioner och 18 deletioner) varierade 0 och 0,13. Provbibliotek framställdes med användning av två loter av Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsens reagens och sekvenseras under sex på varandra följande startdagar med två NovaSeq 6000Dx Instrument och två loter vardera NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler), för totalt tolv sekvenseringskörningar. Detta resulterade i 288 observationer för varje variant i var och en av provspädningarna. LoB och LoD beräknades med den klassiska metoden som anges i CLSI EP17-A2. LoB och LoD beräknades för S2- och S4-reagens separat genom att slå samman variantfrekvenserna för alla varianter i sekvenseringskörningen för varje reagenstyp. Typ I-fel definierades som 0,01 och typ II-fel definierades som 0,05.

LoB utvärderades för 489 loci oberoende över två sekvenseringsloter för varje reagenstyp (S2 eller S4) och biblioteksberedning. För S2-reagens var 95:e percentilen LoB 2,9 %. För S4-reagens var 95:e percentilen LoB 2,2 %.

LoD beräknades framgångsrikt för 478 av 489 varianter för S2 och 485 av 489 varianter för S4. Varianterna där ingen LoD bestämdes för en eller båda biblioteksberedningarna uteslöts från slutlig tilldelning av LoD för NovaSeq 6000Dx-systemet. LoD för NovaSeq 6000Dx systemet med S2- och S4-reagens bestämdes genom att ta den 95:e percentilen av de individuella variant LoDs. För S2-reagens var den 95:e percentilen över 478 varianter av LoDs 4,8 %. För S4-reagens var den 95:e percentilen över 485 LOD-varianter 3,9 %.

Noggrannhet

Germline

Följande studie utfördes för att bedöma variantbestämningsnoggrannheten för Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen på NovaSeq 6000Dx Instrument med användning av NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler). Fyra unika platinagenom-DNA-prover testades med hjälp av en representativ analys utformad för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser (9 232 mål) över alla 23 mänskliga kromosomer. Vart och ett av proverna testades i replikat av 12 förutom NA12880, som testades i replikat av 11. Totalt 18 körningar utfördes med tre sekvenseringsinstrument, tre loter med S2-reagens och två operatörer under sex startdagar. Noggrannheten bestämdes för SNV, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med Platinum Genomes version 2016-1.0.

Tabell 13 Sammanfattning av överensstämmelse i Germline

Kriterier	Totalt antal observationer ¹	Resultat efter observation ²	Resultat, efter körning ³
PPA för SNV	846	99,8	99,9
PPA för insertioner	846	97,9	>99,9
PPA för deletioner	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹Beräknat som antal prover per körning (47) x antal körningar (18) = 846.

²Lägsta observerade värde per provreplikat över alla 18 körningar.

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

Överensstämmelse i Germline per prov på sidan 37 innehåller studiedata presenterade med positiv och negativ procentuell överensstämmelse per prov, där variantresultaten jämförs med Platinum Genomes version 2016-1.0 för PPA-beräkningar. De tre varianttyperna (SNV, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 14 Överensstämmelse i Germline per prov

Prov	Bestämbar autosom	Förväntade varianter ¹	TP	FN	Saknade variantbestämningar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ Totalt antal varianter i alla provreplikat över 18 körningar.

[Överensstämmelse i Germline per prov, efter varianttyp på sidan 37](#) innehåller studiedata som presenteras per prov, där variantresultaten jämförs med den välkarakteriserade sammansatta referensmetoden. Detektering utvärderas för varje varianttyp – SNV, insertioner och deletioner – separat. Referenspositioner ingår inte.

Tabell 15 Överensstämmelse i Germline per prov, efter varianttyp

Prov	SVN			Insertioner			Deletioner		
	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

Proverna analyserades vidare för att bestämma små insertioner och deletioner (indels). En övergripande sammanfattning presenteras i [Sammanfattning av indeldetektering i Germline på sidan 37](#). Det fanns totalt 210 indelar som sträckte sig i storlek från 1–18 bp för insertioner och 1–21 bp för deletioner.

Tabell 16 Sammanfattning av indeldetektering i Germline

Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA
Insertion	36954	36953	1	0	>99,9
Deletion	29358	28986	16	356	99,9

Den representativa analysen bestod av 9 232 mål som täckte en mängd olika genomiskt innehåll. GC-innehållet i målen varierade från 0,20-0,86. Mål hade också en rad enstaka nukleotider (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Data sammanställda per kromosom för att bestämma effekten av genomiskt innehåll på procent korrekta bestämningar presenteras i [Noggrannhet på Germline-kromosomnivå på sidan 38](#). 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 Germline-kromosomnivå

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (18), Deletion (4)	[0,22 0,8]; Median: 0,51	114888718	34	966860	>99,9	0,83
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (5), Deletion (2)	[0,24 0,81]; Median: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Insertion (11), Deletion (1)	[0,25 0,86]; Median: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Insertion (2), Deletion (2)	[0,27 0,77]; Median: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Insertion (8), Deletion (18)	[0,29 0,79]; Median: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Insertion (4), Deletion (2)	[0,24 0,79]; Median: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (4)	[0,2 - 0,77]; Median: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (1)	[0,26 0,78]; Median: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (1)	[0,27 0,83]; Median: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Insertion (1), Deletion (1)	[0,23 0,78]; Median: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (2)	[0,28 0,8]; Median: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Insertion (1), Deletion (5)	[0,26 0,77]; Median: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Insertion (14), Deletion (0)	[0,28 0,79]; Median: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Insertion (4), Deletion (1)	[0,29 0,77]; Median: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Insertion (4), Deletion (6)	[0,29 0,76]; Median: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Insertion (15), Deletion (21)	[0,3 0,76]; Median: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Insättning (18), Deletion (16)	[0,28 0,82]; Median: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Insertion (4), Deletion (0)	[0,22 0,78]; Median: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (21)	[0,33 0,83]; Median: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Insertion (5), Deletion (0)	[0,31 0,84]; Median: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Insertion (2), Deletion (5)	[0,22 0,78]; Median: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Insertion (6), Deletion (0)	[0,27 0,74]; Median: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Insertion (3), Deletion (0)	[0,2 0,72]; Median: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Deletion (0)	[0,4 0,59]; Median: 0,45	0	0	0	Ej tillämpligt	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 9 232 målen var 8 009 mål helt inneslutna i de mycket säkra genomiska regionerna, 776 mål hade partiell överlappning och 447 mål hade ingen överlappning i NIST-sekvensen. Detta resulterade i 1 831 483 koordinater per replikat för jämförelse. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Noggrannhetsresultaten visas i [Överensstämmelse i Germline av NA12878 Sample med NIST Database på sidan 45](#).

Tabell 18 Överensstämmelse i Germline av NA12878 Sample med NIST Database

Prov	Ant. täckta mål	Bestämbar autosom	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Baserat på data från denna könsstudie på 18-körningar kan NovaSeq 6000Dx Instrument konsekvent sekvensera:

- GC-innehåll ≥ 20 % (alla bestämda baser i 1 692 sekvenserade målregioner med 20 % GC-innehåll korrekt bestämda med no-call-grad på 0 %)
- GC-innehåll ≤ 86 % (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 86 % GC-innehåll korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0 %)
- PolyA-längder ≤ 46 (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 46 PolyA-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,27 %)

- PolyT-längder ≤ 40 (13 384 074 av 13 384 321 bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 40 PolyT-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,26 %)
- PolyG-längder ≤ 11 (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 11 PolyG-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0 %)
- PolyC-längder ≤ 8 (9 815 030 av 9 815 035 bestämda baser i 5 922 sekvenserade målregioner med 8 PolyC-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,53 %)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 31x$ (32 233 922 av 32 233 926 bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 31 dinukleotidupprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,21 %)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 23x$ (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 23 trinukleotidupprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,21 %)
- Insertionslängder ≤ 18 (alla anropade baser i 1 692 sekvenserade målregioner med 18 insertioner korrekt bestämda med no-call-frekvens på 7,71 %)
- Deletionslängder ≤ 21 (alla bestämda baser i 1 692 sekvenserade målregioner med 21 deletioner korrekt bestämda med no-call-frekvens på 1,14 %)

Somatic

Följande studie utfördes för att bedöma variantbestämningsnoggrannheten för könslinje FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-applikationen på NovaSeq 6000Dx Instrument med användning av NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler).

Denna studie använde en representativ analys utformad för att undersöka en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser (9 232 mål) över alla 23 mänskliga kromosomer. Platinum Genome DNA extraherades från FFPE-behandlade block för att generera fyra unika prover för utvärdering i studien.

Prov GM12877 DNA späddes med prov GM12878 DNA för att skapa GM12877-13 med unika GM12877 heterozygota och homozygota varianter vid frekvenser nära 6,5 % respektive 13 %. Prov GM12878 DNA späddes på liknande sätt med prov GM12877 DNA för att skapa GM12878-13 med unika GM12878 heterozygota och homozygota varianter vid frekvenser nära 6,5 % respektive 13 %. Outspädda GM12877 och GM12878 testades också. Vart och ett av proverna testades i replikat om 12 förutom outspädd GM12878, som testades i replikat om elva. Totalt arton körningar utfördes med tre sekvenseringsinstrument, tre loter S4-reagens och två operatörer under sex startdagar. Noggrannheten bestämdes för SNV, insertioner och deletioner genom att jämföra resultaten med Platinum Genomes version 2016-1.0.

Tabell 19 Sammanfattning av överensstämmelse i Somatic

Kriterier	Antal observationer ¹	Resultat av observationer ²	Resultat av Körning ³
PPA för somatiska SNV	846	99,8	98,9
PPA för somatiska insertioner	846	100	100
PPA för somatiska deletioner	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ Beräknat som = antal prover per körning (47) x antal körningar (18) = 846.

² Lägsta observerade värde genom provreplikat över alla 18 körningar.

³ Lägsta värde när data från varje körning analyseras sammantaget.

Somatisk överensstämmelse per prov på sidan 47 innehåller studiedata presenterade med positiv och negativ procentuell överensstämmelse per prov, där variantresultaten jämförs med den välkarakteriserade sammansatta referensmetoden för PPA-beräkningar. De tre varianttyperna (SNV, insertioner och deletioner) kombineras. Eftersom referensmetoden endast ger resultat för de enskilda nukleotidvarianterna och insertionerna/deletionerna jämförs basbestämningar utan varianter med den humana referensgenomsekvensen hg19 för beräkning av NPA.

Tabell 20 Somatisk överensstämmelse per prov

Prov	Bestämbar autosom	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

Somatisk överensstämmelse per prov efter varianttyp på sidan 48 innehåller studiedata som presenteras per prov, där variantresultaten jämförs med den välkarakteriserade sammansatta referensmetoden. Detektering utvärderas för varje varianttyp – SNV, insertioner och deletioner – separat. Referenspositioner ingår inte.

Tabell 21 Somatisk överensstämmelse per prov efter varianttyp

Prov	SNV			Insertioner			Deletioner		
	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN	Förväntad	TP	FN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

De fyra proverna analyserades vidare för att bestämma små insertioner och deletioner (indels). En övergripande sammanfattning presenteras i [Sammanfattning av somatisk indeldetektering på sidan 48](#). Det fanns totalt 210 indelar som sträckte sig i storlek från 1–18 bp för insertioner och 1–21 bp för deletioner.

Tabell 22 Sammanfattning av somatisk indeldetektering

Varianttyp	Förväntade varianter	TP	FN	Saknade variantbestämningar	PPA
Insertion	11772	11772	0	0	100
Deletion	10098	9666	0	432	100

Den representativa analysen bestod av 9 232 mål som täckte en mängd olika genomiskt innehåll. GC-innehållet i målen varierade från 0,20–0,86. Mål hade också en rad enstaka nukleotider (t.ex. PolyA, PolyT), dinukleotid- och trinukleotidupprepningar. Data sammanställda per kromosom för att bestämma effekten av genomiskt innehåll på procent korrekta bestämningar presenteras i [Noggrannhet på somatisk kromosomnivå på sidan 49](#). Procentandelen korrekta bestämningar utgörs av variant- och referensbestämningar och är lägre än 100 % om det förekommer antingen felaktiga eller saknade bestämningar.

Tabell 23 Noggrannhet på somatisk kromosomnivå

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (3), Deletion (0)	[0,22 - 0,8]; Median: 0,51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (5), Deletion (1)	[0,24 - 0,81]; Median: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Insertion (1), Deletion (1)	[0,25 - 0,86]; Median: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Insertion (0), Deletion (1)	[0,27 - 0,77]; Median: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Insertion (8), Deletion (18)	[0,29 - 0,79]; Median: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Insertion (0), Deletion (1)	[0,24 - 0,79]; Median: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (4)	[0,2 - 0,77]; Median: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (0)	[0,26 - 0,78]; Median: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Insertion (0), Deletion (1)	[0,27 - 0,83]; Median: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Insertion (0), Deletion (0)	[0,23 - 0,78]; Median: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (2)	[0,28 - 0,8]; Median: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Insertion (0), Deletion (3)	[0,26 - 0,77]; Median: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Insertion (14), Deletion (0)	[0,28 - 0,79]; Median: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Insertion (4), Deletion (0)	[0,29 - 0,77]; Median: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Insertion (4), Deletion (0)	[0,29 - 0,76]; Median: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Insertion (15), Deletion (21)	[0,3 - 0,76]; Median: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Insertion (18), Deletion (1)	[0,28 - 0,82]; Median: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Insertion (0), Deletion (0)	[0,22 - 0,78]; Median: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion(3)	[0,33 - 0,83]; Median: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Insertion (5), Deletion (0)	[0,31 - 0,84]; Median: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (0)	[0,22 - 0,78]; Median: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Insertion (6), Deletion (0)	[0,27 - 0,74]; Median: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6

Kromosom	Ant. gener	Ant. mål	Ant. baser	Genomiskt innehåll	GC-intervall	Korrekta bestämningar	Felaktiga bestämningar	Saknade bestämningar	% korrekta best	%Saknade bestämningar
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Insertion (3), Deletion (0)	[0,2 - 0,72]; Median: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Deletion (0)	[0,4 - 0,59]; Median: 0,45	0	0	0	Ej tillämpligt	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 9 232 målen var 8 009 mål helt inneslutna i de mycket säkra genomiska regionerna, 776 mål hade partiell överlappning och 447 mål hade ingen överlappning i NIST-sekvensen. Detta resulterade i 1 831 483 koordinater per replikat för jämförelse. Basbestämningar utan varianter jämfördes med den humana referensgenomsekvensen hg19. Noggrannhetsresultaten visas i [Somatisk överensstämmelse av GM12878-prov med NIST Database på sidan 56](#).

Tabell 24 Somatisk överensstämmelse av GM12878-prov med NIST Database

Prov	Ant. täckta mål	Bestämbar autosom	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Baserat på data från denna somatiska studie på 18-körningar kan NovaSeq 6000Dx Instrument konsekvent sekvensera:

- GC-innehåll ≥ 20 % (alla bestämda baser i 1 692 sekvenserade målregioner med 20 % GC-innehåll korrekt bestämda med no-call-frekvens på 0,34 %)
- GC-innehåll ≤ 86 % (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 86 % GC-innehåll korrekt bestämda med no-call-frekvens på 4,21 %)
- PolyA-längder ≤ 46 (14 550 082 av 14 550 083 bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 46 PolyA-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 4,18 %)

- PolyT-längder ≤ 40 (12 833 489 av 12 833 491 bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 40 PolyT-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 4,37 %)
- PolyG-längder ≤ 11 (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 11 PolyG-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 7,59 %)
- PolyC-längder ≤ 8 (9 405 604 av 9 405 615 bestämda baser i 5 922 sekvenserade målregioner med 8 PolyC-upprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 4,68 %)
- Dinukleotidupprepningslängder $\leq 31x$ (30 996 684 av 30 996 712 bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 31 dinukleotidupprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 4,04 %)
- Trinukleotidupprepningslängder $\leq 23x$ (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 23 trinukleotidupprepningar korrekt bestämda med no-call-frekvens på 5,39 %)
- Insertionslängder ≤ 18 (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 18 insertioner korrekt bestämda med no-call-frekvens på 1,44 %)
- Deletionslängder ≤ 21 (alla bestämda baser i 846 sekvenserade målregioner med 21 deletioner korrekt bestämda med no-call-frekvens på 7,86 %)

Precision

Precisionen av NovaSeq 6000Dx Instrument utvärderades med hjälp av platinagenomprover med en representativ analys utformad för att fråga en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över 23 olika kromosomer med användning av 9 232 måloligo. Totalt 1 723 riktade små varianter (SNV, insertioner och deletioner) utvärderades. Germline-testning bestod av elva eller tolv replikat av fyra unika platinagenomprover. Somatisk testning bestod av elva eller tolv replikat av fyra unika FFPE-behandlade platinagenomprover på olika VAF-nivåer. Provbibliotek framställdes med användning av Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsens reagens.

Testning utfördes på en intern plats med tre NovaSeq 6000Dx Instrument, tre loter vardera av NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler), och två operatörer under sex startdagar. För varje startdag sekvenserades könscellprovbibliotek på ena instrumentsidan med hjälp av S2-reagens och Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen, och somatiska provbibliotek sekvenserades på den andra instrumentsidan med S4-reagens och Somatic FASTQ och VCF genereringsanalys arbetsflöde för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen. Denna testning resulterade i 18 flödesceller för var och en av könscell- och somatiska arbetsflödena.

Germline

För könscellkörningar (germline) rapporteras genomiska platser där en riktad könscellvariant detekteras som positiva (variant). För förväntade positiva könscellvarianter utvärderades data för no-call-frekvens och procentandel positiv bestämning (PPC) inom varje varianttyp (SNV, insertion, deletion).

[Precisionsobservationer av könscellbestämning inom laboratoriet för förväntade positiva resultat per varianttyp på sidan 58](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de nedre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden för varje varianttyp.

Tabell 25 Precisionsobservationer av könscellbestämning inom laboratoriet för förväntade positiva resultat per varianttyp

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade positiva bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insertion	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Deletion	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Saknade bestämningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Positiv bestämning definieras som riktade kromosompositioner där en variant detekteras.

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

Genomiska platser där en riktad variant inte detekteras rapporteras som negativa (vildtyp). För förväntade negativa platser utvärderades uppgifterna för no-call-frekvens och procent negativ bestämning (PNC).

[Precisionsobservationer av könscellbestämning inom laboratoriet för förväntade negativa resultat på sidan 59](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de nedre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden.

Tabell 26 Precisionsobservationer av könscellbestämning inom laboratoriet för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade negativa bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Vildtyp	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Saknade bestämningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Negativ bestämning definierad som målinriktade kromosompositioner där en variant inte detekteras.

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

Bidraget från varje parameter (instrument, reagenslot, dag, biblioteksreplik) till den totala variabiliteten bestämdes genom varianskomponentanalys med användning av variantfrekvens som svarsvariabel. Den totala standardavvikelsen hade ett medelvärde på 0,0370. Den största bidragsgivaren till variantfrekvensvariabilitet var från biblioteksförberedande replikat, vilket bidrog till 17,1 % av den totala variabiliteten. Dag bidrog till 1 % medan instrument och reagenslot var och en bidrog till mindre än 1 % av den totala variationen

[Precisionsvarianskomponenter inom laboratoriets uppskattningar för provvariantfrekvenser i Germline på sidan 59](#) (SD = standardavvikelse).

Tabell 27 Precisionsvarianskomponenter inom laboratoriets uppskattningar för provvariantfrekvenser i Germline

Komponent	Genomsnittlig SD	Genomsnittlig % av totalt SD
Dag	0,0020	1,028
Instrument	0,0018	0,837
Förbrukningsmateriallot	0,0016	0,712
Biblioteksreplikering	0,0143	17,110
Totalt	0,0370	100

Somatic

För somatiska körningar rapporteras genomiska platser där en målinriktad somatisk variant detekteras som positiva (variant). För utspädda prover GM12877-13 och GM12878-13 med förväntade positiva somatiska varianter vid VAF mellan 6,5 % och 13 %, utvärderades data för no-call-frekvens och procent positiv bestämning (PPC) inom varje varianttyp (SNV, insertion, deletion). [Somatiska bestämningsobservationer inom laboratoriet för förväntade positiva resultat efter varianttyp \(VAF är \$\geq 6,5\%\$ och \$\leq 13\%\$ \) på sidan 60](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden, för varje varianttyp.

Tabell 28 Somatiska bestämningsobservationer inom laboratoriet för förväntade positiva resultat efter varianttyp (VAF är $\geq 6,5\%$ och $\leq 13\%$)

Varianttyp	Observerade saknade bestämmningar ¹	Totalt antal bestämmningar	Andel saknade bestämmningar	Observerade positiva bestämmningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämmningar	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insertion	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Deletion	0	2 912	0	2907	2 912	99,83	99,60	99,93

¹ Saknade bestämmningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Positiv bestämning definieras som riktade kromosompositioner där en variant detekteras.

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

Genomiska platser där en riktad somatisk variant inte detekteras rapporteras som negativa (vildtyp). För förväntade negativa platser utvärderades uppgifterna för no-call-frekvens och procent negativa bestämmningar.

[Somatiska bestämningsobservationer inom laboratoriet för förväntade negativa resultat på sidan 60](#)

sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden, för varje varianttyp.

Tabell 29 Somatiska bestämningsobservationer inom laboratoriet för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Observerade saknade bestämmningar ¹	Totalt antal bestämmningar	Andel saknade bestämmningar	Observerade negativa bestämmningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämmningar	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Vildtyp	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Saknade bestämmningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Negativ bestämning definierad som målinriktade kromosompositioner där en variant inte detekteras.

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

Bidraget från varje parameter (instrument, reagenslot, dag, biblioteksreplik) till den totala variabiliteten bestämdes genom varianskomponentanalys med användning av variantfrekvens som svarsvariabel. Den totala standardavvikelsen hade ett medelvärde på 0,0062. Bibliotekets prep-replik förblev den viktigaste källan till variabilitet och stod för 50,7 % av totalen. Dag, instrument och förbrukningsmateriallot bidrog alla till mindre än 1 % av den totala variationen [Precisionsvariaskomponenter inom laboratoriets uppskattningar för somatiska provvariantfrekvenser på sidan 60](#) (SD = standardavvikelse).

Tabell 30 Precisionsvariaskomponenter inom laboratoriets uppskattningar för somatiska provvariantfrekvenser

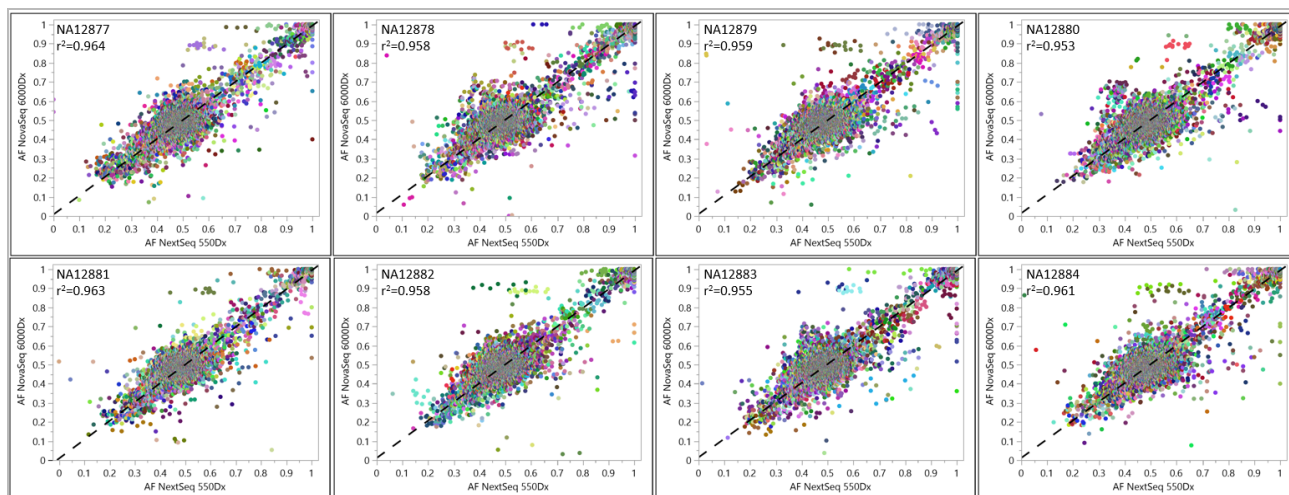
Komponent	Genomsnittlig SD	Genomsnittlig % av totalt SD
Dag	0,0002	0,41
Instrument	0,0002	0,40
Förbrukningsmateriallot	0,0002	0,35

Komponent	Genomsnittlig SD	Genomsnittlig % av totalt SD
Biblioteksreplikering	0,0044	50,7
Totalt	0,0062	100

Metodjämförelse

En studie utfördes för att jämföra prestanda mellan instrumenten NovaSeq 6000Dx och NextSeq 550Dx. Variantfrekvensöverensstämmelse för blodprover utvärderades med hjälp av en representativ analys utformad för att söka efter en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över alla 23 mänskliga kromosomer. Åtta platinagenom-DNA-prover testades, sju i replikat av sex och ett (NA12881) i replikat av fem. Bibliotek sekvenserades med hjälp av NovaSeq 6000Dx Instrument Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för applikationen DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx och på NextSeq 550Dx-instrumentet med DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager-modulen. [Variant Frequency Correlation Plots \(Plots färgas av unik variant. Varianter kan färgas olika i varje enskild plot.\)](#) på sidan 61 plottar VAF-korrelationen mellan de två instrumenten för varje prov. Baserat på den starka korrelationen mellan NovaSeq 6000Dx Instrument och NextSeq 550Dx Instrument har prestandaegenskaper relaterade till preanalytiska faktorer (t.ex. extraktionsmetoder eller störande ämnen) fastställts vara tillämpliga på båda instrumenten. Se bipacksedeln Illumina DNA Prep with Enrichment Dx för ytterligare information.

Figur 15 Variant Frequency Correlation Plots (Plots färgas av unik variant. Varianter kan färgas olika i varje enskild plot.)



Reproducerbarhet

Reproducerbarheten av NovaSeq 6000Dx Instrument utvärderades med hjälp av platinagenomprover med en representativ analys utformad för att fråga en mängd olika gener som täcker 1 970 505 baser över 23 olika kromosomer med 9 232 måloligo. Totalt 1 723 riktade små varianter (SNV, insertioner och deletioner)

utvärderades. Germline-testning bestod av tre eller fyra replikat av tolv unika platinaprover. Somatisk testning bestod av fem eller sex replikat av åtta unika FFPE-behandlade platinagenomprover på olika VAF-nivåer. Provbibliotek framställdes med användning av Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satsens reagens.

Testning utfördes på tre externa platser med en lot vardera av NovaSeq 6000Dx S2 Reagent v1.5 Kit (300 cykler) och NovaSeq 6000Dx S4 Reagent v1.5 Kit (300 cykler). En enkel NovaSeq 6000Dx Instrument användes på varje plats. Två operatörer utförde testerna vid varje laboratorium. Varje operatör utförde testning på tre icke på varandra följande startdagar för varje provtyp för totalt 36 flödesceller över de tre platserna. För varje startdag sekvenserades könszellprovbibliotek på ena instrumentsidan A med hjälp av S2-reagens och Germline FASTQ- och VCF-genereringsanalysarbetsflödet för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen, och somatiska provbibliotek sekvenserades på den instrumentsida B med S4-reagens och Somatic FASTQ och VCF genereringsanalysarbetsflöde för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx applikationen. Denna testning resulterade i 18 flödesceller för var och en av könszell- och somatiska arbetsflödena.

Germline

För könszellkörningar (germline) rapporteras genomiska platser där en riktad könszellvariant detekteras som positiva (variant). För förväntade positiva könszellvarianter utvärderades data för no-call-frekvens och procentandel positiv bestämning (PPC) inom varje varianttyp (SNV, insertion, deletion). [Observationer av könszellbestämning för förväntade positiva resultat per varianttyp på sidan 62](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden, för varje varianttyp.

Tabell 31 Observationer av könszellbestämning för förväntade positiva resultat per varianttyp

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade positiva bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insertion	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Deletion	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Saknade bestämningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Positiv bestämning definieras som riktade kromosompositioner där en variant detekteras.

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

Genomiska platser där en riktad variant inte detekteras rapporteras som negativa (vildtyp). För förväntade negativa platser utvärderades uppgifterna för no-call-frekvens och procent negativ bestämning (PNC). [Observationer av könszellbestämning för förväntade negativa resultat på sidan 63](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden.

Tabell 32 Observationer av könszellbestämning för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade negativa bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Vildtyp	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Saknade bestämningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Negativ bestämning definierad som målinriktade kromosompositioner där en variant inte detekteras.

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

Somatic

För somatiska körningar rapporteras genomiska platser där en målinriktad somatisk variant detekteras som positiva (variant). För förväntade positiva somatiska varianter där medelvariantallelfrekvensen (VAF) är större än eller lika med 14 % och mindre än eller lika med 28 %, utvärderades data för no-call-frekvens och procent positiv bestämning (PPC) inom varje varianttyp (SNV, insertion, deletion). [Somatiska bestämningsobservationer för förväntade positiva resultat efter varianttyp \(medelvärde för VAF \$\geq\$ 14 % och \$\leq\$ 28 %\) på sidan 63](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden, för varje varianttyp.

Tabell 33 Somatiska bestämningsobservationer för förväntade positiva resultat efter varianttyp (medelvärde för VAF \geq 14 % och \leq 28 %)

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade positiva bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insertion	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Deletion	0	2 142	0	2098	2 142	97,95	97,25	98,47

¹ Saknade bestämningar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Positiv bestämning definieras som riktade kromosompositioner där en variant detekteras.

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

Genomiska platser där en riktad somatisk variant inte detekteras rapporteras som negativa (vildtyp). För förväntade negativa platser utvärderades uppgifterna för no-call-frekvens och procent negativa bestämningar. [Somatiska bestämningsobservationer för förväntade negativa resultat på sidan 63](#) sammanfattar de observerade frekvenserna, tillsammans med de lägre och övre 95 % konfidensnivåerna (LCL/UCL) beräknade med Wilson Score-metoden, för varje varianttyp.

Tabell 34 Somatiska bestämningsobservationer för förväntade negativa resultat

Varianttyp	Observerade saknade bestämningar ¹	Totalt antal bestämningar	Andel saknade bestämningar	Observerade negativa bestämningar ²	Totalt antal utvärderbara bestämningar	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Vildtyp	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Saknade bestämmingar definierat som målinriktad kromosomposition där en variant inte kan fastställas (på grund av lågt täckningsdjup).

² Negativ bestämning definierad som målinriktade kromosompositioner där en variant inte detekteras.

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

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 200025276 v01	September 2022	Uppdaterade precisionsdata för observationer av köns-cellbestämning.
Dokumentnr 200025276 v00	Augusti 2022	Första utgåvan.

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 här. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas noggrant och uttryckligen av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivningen här. 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).

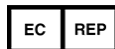
© 2022 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

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

Kontaktinformation



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



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

Australisk sponsor

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

Märkning av produkter

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