

## Packungsbeilage

FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSTIK. NUR FÜR DEN EXPORT.

**Katalog-Nr. 20005715**

## Verwendungszweck

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

## Verfahrensprinzipien

Das Illumina NextSeq 550Dx Gerät ist zur Sequenzierung von DNA-Bibliotheken mit *In-vitro*-Diagnostik-Assays sowie zur Verwendung durch Laborpersonal vorgesehen, das für die Durchführung von *In-vitro*-Diagnostikverfahren in einem klinischen Labor qualifiziert und entsprechend geschult ist. Für die Zugabe nutzt das NextSeq 550Dx aus DNA generierte Bibliotheken, bei denen amplifizierten Targets Probenindizes und Erfassungssequenzen hinzugefügt werden. Die Probenbibliotheken werden auf einer Fließzelle erfasst und auf dem Gerät unter Verwendung von SBS-Chemie (Sequenzierung durch Synthese) sequenziert. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Die Software Real-Time Analysis (RTA) führt die Bildanalyse sowie das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zu. Nach Abschluss der Primäranalyse kann die Sekundäranalyse auf dem Gerät ausgeführt werden, um Base-Calls zu verarbeiten. Das NextSeq 550Dx verwendet je nach Workflow verschiedene Module für die Sekundäranalyse. Für das Germline Variant Modul bzw. das Somatic Variant Modul umfasst die Verarbeitung das Demultiplexing, Generieren von FASTQ-Dateien, Alignment, Varianten-Calling sowie das Generieren von Dateien im Variant Call Format (VCF und gVCF). Die VCF- und gVCF-Dateien enthalten Informationen zu Varianten, die an bestimmten Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

## Dual-Boot-Konfiguration

Das NextSeq 550Dx verfügt über eine Dual-Boot-Konfiguration, die es ermöglicht, das Gerät entweder im Diagnostik-Modus (Dx) oder im nur für Forschungszwecke-Modus (RUO) zu betreiben. Sequenzierungsassays für die *In-vitro*-Diagnostik, einschließlich des Germline Variant Moduls und des Somatic Variant Moduls, werden im Diagnostikmodus durchgeführt. Im Diagnostikmodus können nur IVD-Sequenzierungsreagenzien verwendet werden. Die Leistungsmerkmale und Verfahrenseinschränkungen für das NextSeq 550Dx Gerät wurden mittels des Germline Variant Moduls und des Somatic Variant Moduls im Diagnostikmodus bestimmt.

# Einschränkungen des Verfahrens

1. Für die *In-vitro*-Diagnostik.
2. Das Germline Variant Modul bzw. das Somatic Variant Modul liefern beim Einsatz mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) oder dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) Folgendes:
  - Sequenzierungsausgabe  $\geq 90$  Gigabasen (Gb)
  - Read-Länge (bei Paired-End-Läufen) von 2 x 150 Basenpaaren (bp)
  - Anteil der Basen mit Q30 oder höher beträgt  $\geq 75$  % bei einer Read-Länge von 2 x 150 bp  
75 % der Basen oder mehr haben Qualitäts-Scores auf der Phred-Skala von  $\geq 30$ , was auf eine Base-Call-Genauigkeit von über 99,9 % hindeutet.
3. Reads mit Indels (Insertionen, Deletionen und Kombinationen daraus), deren Inhalt eine Länge von  $> 25$  bp aufweist, werden von der Assay-Software nicht aligniert. Folglich können Indels mit einer Länge  $> 25$  bp von der Assay-Software nicht identifiziert werden.
4. Amplikon-Reads mit extremen Varianteninhalten werden möglicherweise von der Assay-Software nicht aligniert, was dazu führt, dass die Region als Wildtyp gemeldet wird. Zu extremen Inhalten gehören:
  - Reads mit mehr als drei Indels
  - Reads mit einer Länge von mindestens 30 bp und einem Einzelnukleotidvariante (SNV)-Gehalt von  $> 4$  % der Gesamtlänge des Amplikon-Targets (ohne Sondenregionen)
  - Reads mit einer Länge  $< 30$  bp und einem SNV-Inhalt  $> 10$  % der Gesamtlänge des Amplikons (einschließlich Sondenregionen)
5. Große Varianten wie Mehrfachnukleotidvarianten (MNV) und große Indels werden in der VCF-Ausgabedatei möglicherweise als separate kleinere Varianten aufgeführt.
6. Deletions-Varianten werden ggf. herausgefiltert oder verpasst, wenn sie zwei Amplikons auf der Platte umfassen und die Länge der Deletion der Überlappung der beiden Amplikons entspricht oder diese übertrifft.
7. Das System kann keine Indels erkennen, wenn diese unmittelbar an einen Primer angrenzend auftreten und es kein überlappendes Amplikon gibt. Der Assay kann in Regionen mit überlappenden Amplikons keine Deletionen erkennen, wenn die überlappende Region kleiner als die zu erkennende Deletion ist. Wenn es sich bei der überlappenden Region zwischen zwei angrenzenden Amplikons beispielsweise um zwei Basen handelt, kann der Assay keine Deletionen erkennen, die beide Basen umfassen. Die Deletion einer einzelnen Base bei einer dieser Basen kann erkannt werden.
8. Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Workflow zur Bibliotheksvorbereitung können zugrunde liegende Polymorphismen, Mutationen, Insertionen oder Deletionen in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und die Anzahl der während der Sequenzierung erfolgten Calls beeinträchtigen. Beispiele:
  - Eine Variante in der Phase mit einer Variante in der Primer-Region wird möglicherweise nicht amplifiziert, was zu einem falsch negativen Ergebnis führt.

- Varianten in der Primer-Region könnten die Amplifikation des Referenz-Allels verhindern, was zu einem fehlerhaften homozygoten Varianten-Call führt.
  - Indel-Varianten in der Primer-Region können an dem an den Primer angrenzenden Read-Ende zu einem falsch positiven Call führen.
9. Indels können aufgrund von Strangverzerrungen herausgefiltert werden, wenn sie in der Nähe eines Read-Endes auftreten und während des Alignments einem Soft-Clipping unterzogen werden.
10. Kleine MNVs wurden nicht validiert und werden nur im Somatic Variant Modul gemeldet.
11. Deletionen werden in der VCF an der Koordinate der vorhergehenden Base gemäß VCF-Format ausgegeben. Daher müssen benachbarte Varianten in Betracht gezogen werden, bevor ein individueller Base-Call als homozygote Referenz aufgeführt wird.
12. Keimbahn-spezifische Einschränkungen:
- Unter Verwendung des Local Run Manager Germline Variant Moduls für NextSeq 550Dx ist das NextSeq 550Dx Gerät darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Keimbahn-Varianten-Calling (z. B. homozygote, heterozygote oder Wildtyp-Ergebnisse) zu liefern.
  - Bei Verwendung in Kombination mit dem Germline Variant Modul beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindest-Coverage pro Amplikon das 150-Fache. Daher werden 150 DNA-Fragmente benötigt, was 300 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Coverage. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Coverage beeinträchtigen.
  - Kopienzahlvarianten haben einen Einfluss darauf, ob eine Variante als homozygot oder heterozygot identifiziert wird.
  - Varianten in bestimmten repetitiven Kontexten werden in den VCF-Dateien herausgefiltert. Der RMxN-Repeat-Filter wird verwendet, um Varianten zu filtern, wenn die gesamte oder ein Teil der Variantensequenz im Referenzgenom angrenzend an die Variantenposition wiederholt vorkommt. Beim Keimbahn-Varianten-Calling werden Varianten nur dann gefiltert, wenn mindestens neun Repeats in der Referenz vorhanden sind. Dabei werden nur Repeats mit Längen von bis zu 5 bp (R5 x 9) berücksichtigt.
  - Das Auftreten von einem Indel und einer SNV an einem einzelnen Locus kann dazu führen, dass nur eine Variante gemeldet wird.
13. Spezifische Einschränkungen für das Somatic Variant Modul:
- Unter Verwendung des Local Run Manager Somatic Variant Moduls für NextSeq 550Dx Gerät ist das NextSeq 550Dx Gerät darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von somatischen Varianten (z. B. das Vorhandensein einer somatischen Variante mit einer Variantenfrequenz größer oder gleich 0,026 mit einer Nachweisgrenze von 0,05) zu liefern.
  - Bei Verwendung in Kombination mit dem Somatic Variant Modul beträgt die für ein genaues Varianten-Calling benötigte Mindest-Coverage pro Amplikon das 450-Fache pro Oligonukleotid-Pool. Daher werden pro Oligonukleotid-Pool 450 DNA-Fragmente benötigt, was 900 überlappenden Paired-End-Reads entspricht. Die Anzahl der Proben und die Gesamtzahl der Zielbasen beeinflussen die Coverage. GC-Inhalt und andere genomische Inhalte können die Coverage beeinträchtigen.

- Beim Calling somatischer Varianten werden Varianten nur dann gefiltert, wenn mindestens sechs Repeats in der Referenz vorhanden sind. Dabei werden nur Repeats mit Längen von bis zu 3 bp (R3 x 6) berücksichtigt.
- Das Somatic Variant Modul kann nicht zwischen Keimbahn- und somatischen Varianten unterscheiden. Das Modul ist darauf ausgelegt, Varianten über einen Bereich von Variantenhäufigkeiten hinweg zu erkennen. Jedoch kann die Variantenhäufigkeit nicht dazu verwendet werden, um somatische Varianten von Keimbahn-Varianten zu unterscheiden.
- Normales Gewebe in der Probe beeinträchtigt den Nachweis von Varianten. Die gemeldete Nachweishgrenze basiert auf einer Variantenhäufigkeit bezogen auf die Gesamt-DNA, die aus dem Tumor und normalem Gewebe extrahiert wurde.

## Produktkomponenten

Der Illumina NextSeq 550Dx besteht aus:

1. NextSeq 550Dx Gerät, (Katalog-Nr. 20005715)
2. Zu den Softwarekomponenten für das NextSeq 550Dx Gerät gehören:

Softwareanwendung	Funktion	Beschreibung
NextSeq 550Dx Operating Software (NOS)	Steuert den Betrieb des Geräts.	Die Softwareanwendung NOS steuert den Betrieb des Geräts während der Sequenzierung und generiert Bilder, die anschließend von der Software Real-Time Analysis (RTA) verwendet werden.
Real-time Analysis Software (RTA)	Führt die Primäranalyse durch.	Die Softwareanwendung RTA konvertiert die von der NOS für jede Platte pro Zyklus des Sequenzierungslaufs erzeugten Bilder in Base-Call-Dateien. Diese werden anschließend von den Local Run Manager-Analysenmodulen verarbeitet. Die RTA-Softwareanwendung verfügt nicht über eine Benutzeroberfläche.
Local Run Manager	Benutzeroberfläche für die Modulauswahl	Die Software Local Run Manager ist eine im Gerät integrierte Lösung für die Benutzerverwaltung, die Auswahl des entsprechenden Analysemoduls und die Statusüberwachung.
Somatic Variant Modul	Führt die Sekundäranalyse durch	Dieses Local Run Manager-Analysenmodul verarbeitet Base-Calls über die Sekundäranalyse. Die Verarbeitung umfasst das Demultiplexing, die Generierung von FASTQ-Dateien, das Alignment, das Varianten-Calling und die Berichterstellung. Der Varianten-Caller (Pisces) generiert VCF-Dateien mit Informationen zu Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden. In den Dateien wird auch die festgestellte Variantenfrequenz protokolliert.
Germline Variant Modul	Führt die Sekundäranalyse durch	Dieses Local Run Manager-Analysenmodul verarbeitet Base-Calls über die Sekundäranalyse. Die Verarbeitung umfasst das Demultiplexing, die Generierung von FASTQ-Dateien, das Alignment, das Varianten-Calling und die Berichterstellung. Der Varianten-Caller (Pisces) generiert VCF-Dateien mit Informationen zu Varianten, die an spezifischen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden, und identifiziert jede Variante als heterozygot oder homozygot.

3. **Optional** Illumina DRAGEN Server für NextSeq 550Dx (Katalog-Nr. 20086130), einschließlich der folgenden Softwarekomponente:

Softwareanwendung	Funktion	Beschreibung
Illumina Run Manager	Schnittstelle zur Auswahl des Anwendungsmoduls.	Die Illumina Run Manager-Software ist auf dem optionalen, geräteexternen DRAGEN-Server installiert. Illumina Run Manager ermöglicht die Benutzerverwaltung, die Auswahl des Analysemoduls und die Überwachung des Sequenzierungslaufs und des Analysestatus.

Der optionale Illumina DRAGEN-Server für NextSeq 550Dx ist nur in ausgewählten Ländern erhältlich. Informationen zur Verfügbarkeit in Ihrer Region erhalten Sie von einem Illumina-Vertreter.

## Betriebsbedingungen

Weitere Informationen zu den Betriebsbedingungen finden Sie im Abschnitt „Umgebungsanforderungen“ im *Handbuch zur Standortvorbereitung für das NextSeq 550Dx Gerät (Dokument-Nr. 1000000009869)*.

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

## Geräte und Materialien

### Erforderliche, separat erhältliche Geräte und Materialien

NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 Zyklen), Katalog-Nr. 20028870

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

### Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

#### Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für Sequenzierungsläufe

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

## Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für die Gerätewartung

Verbrauchsmaterial	Lieferant	Zweck
NaOCl, 5 % (Natriumhypochlorit)	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305 (oder vergleichbare Laborqualität)	Waschen des Geräts mithilfe der manuellen Nachwaschung; verdünnt auf 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Waschen des Geräts mit manuellen Waschoptionen; verdünnt auf 0,05 %
Wasser, Laborqualität	Allgemeiner Laborlieferant	Waschen des Geräts (manueller Waschlauf)
Luftfilter	Illumina, Katalog-Nr. 20063988	Reinigen der Luft, die das Gerät zur Kühlung aufnimmt

## Richtlinien für Wasser in Laborqualität

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

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

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



### VORSICHT

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

1. **Einige Komponenten der von Illumina bereitgestellten Reagenzien für das NextSeq 550Dx Gerät enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Weitere umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**
2. Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedslandes, in dem sich Anwender und Patient befinden.

3. Handhaben Sie alle Blutproben so, als wären sie mit Humanes Immundefizienzvirus (HIV), Humanes Hepatitis-B-Virus (HBV) oder anderen über das Blut übertragenen Erregern infiziert (allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen).
4. Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Probenqualität führen.
5. Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien gründlich die Hände.
6. Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Geräten und Proben genomischer DNA durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
7. Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontamination sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über dafür vorgesehene Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Hitzeblöcke, Vortexer und Zentrifugen) verfügen.
8. Die Index-zu-Proben-Paarung muss genau dem ausgedruckten Platten-Layout entsprechen. Local Run Manager füllt die Index-Primer automatisch mit den zugehörigen Probennamen aus, wenn diese in das Modul eingegeben werden. Dem Benutzer wird empfohlen, vor dem Start des Sequenzierungslaufs die mit Proben verbundenen Index-Primer zu überprüfen. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.
9. Es wird dringend empfohlen, eine (vom Benutzer bereitzustellende) Virenschutz-Software zu installieren, um den Computer vor Viren zu schützen. Installationsanweisungen finden Sie im Benutzerhandbuch.
10. Betreiben Sie das NextSeq 550Dx nicht, wenn irgendein Gehäuseteil entfernt wurde. Wenn Sie das Gerät betreiben, während eines oder mehrere Gehäuseteile entfernt sind, sind Sie möglicherweise Netz- und Gleichstromspannungen ausgesetzt.
11. Berühren Sie nicht den Fließzellentisch in der Fließzellenkammer. Das Heizelement in der Kammer arbeitet bei 22 °C bis 95 °C, sodass es zu Verbrennungen kommen kann.
12. Das Gerät wiegt etwa 185 kg und kann schwere Verletzungen verursachen, wenn es fallen gelassen oder falsch gehandhabt wird.

## Gebrauchsanweisung

Die folgende Gebrauchsanweisung für das NextSeq 550Dx Gerät erfordert Reagenzien, die im NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) oder NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 Zyklen) enthalten sind.

## Erstellen eines Laufs

Erstellen Sie einen Sequenzierungslauf mit Local Run Manager oder Illumina Run Manager. Anweisungen zur Verwendung von Local Run Manager finden Sie unten im NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Dokument-Nr. 1000000009513). Anweisungen zur Erstellung eines Laufs mit Illumina Run Manager finden Sie im Illumina Run Manager für NextSeq 550Dx Softwarehandbuch (Dokument-Nr. 200025239).

Anweisungen zur Auswahl zwischen Local Run Manager oder Illumina Run Manager finden Sie im Illumina Run Manager für NextSeq 550Dx Softwarehandbuch (Dokument-Nr. 200025239). Ausführliche Anweisungen zu bestimmten Anwendungen finden Sie im Modul oder in der Gebrauchsanweisung für den jeweiligen Assay.

Die folgenden Anweisungen beziehen sich auf die Verwendung des Local Run Manager Germline Variant Moduls und des Somatic Variant Moduls.

### Festlegen von Parametern

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

### Importieren von Manifestdateien für den Lauf

1. Stellen Sie sicher, dass die gewünschten Manifestdateien an einem zugänglichen Netzwerkspeicherort oder auf einem USB-Laufwerk verfügbar sind.

2. Wählen Sie **Import Manifests** (Manifeste importieren).
3. Navigieren Sie zur Manifestdatei und wählen Sie die Manifeste aus, die Sie hinzufügen möchten.

**HINWEIS** Um Manifestdateien für alle Läufe verfügbar zu machen, die das Analysemodul Germline Variant bzw. Somatic Variant verwenden, fügen Sie die Dateien über die Funktion „Module Settings“ (Moduleinstellungen) hinzu. Für diese Funktion werden Administratorrechte benötigt. Weitere Informationen finden Sie im *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (Dokument-Nr. 1000000009513).

## Angeben der Proben für den Lauf

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

**Manuelles Eingeben der Proben:** Verwenden Sie die leere Tabelle auf dem Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen).

**Importieren von Proben:** Navigieren Sie zu einer externen Datei mit kommagetrennten Werten (\*.csv). Im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) steht eine Vorlage zum Herunterladen zur Verfügung.

## Manuelles Eingeben der Proben

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

- Wählen Sie das Symbol  **Print** (Drucken), um das Plattenlayout anzuzeigen. Wählen Sie **Print** (Drucken), um es auszudrucken.
  - Wählen Sie **Export** (Exportieren), um Probeninformationen in eine externe Datei zu exportieren.
8. Wählen Sie **Save Run** (Lauf speichern).

## Importieren von Proben

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

## Vorbereiten der Reagenzienkartusche

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

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

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

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

3. Invertieren Sie die Kartusche fünfmal, um die Reagenzien zu mischen.
4. Untersuchen Sie den Boden der Kartusche, um sicherzustellen, dass die Reagenzien aufgetaut und frei von Ausfällungen sind. Vergewissern Sie sich, dass die Positionen 29, 30, 31 und 32 aufgetaut sind. Sie sind größer als die anderen und brauchen am längsten, um aufzutauen.

5. Klopfen Sie die Kartusche leicht auf den Tisch, um die Anzahl der Luftblasen zu verringern.  
Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

## Vorbereiten der Fließzelle

1. Nehmen Sie einen neuen Fließzellenkarton aus der Kühllagerung bei 2 °C bis 8 °C.
2. Nehmen Sie die Folienverpackung aus dem Karton und legen Sie sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur beiseite.

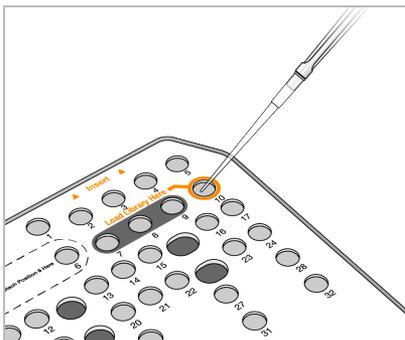
## Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung

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

## Laden der Bibliotheken in die Reagenzienkartusche

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

Abbildung 1 Laden der Bibliotheken



## Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs

Vollständige Anweisungen zur Einrichtung des Laufs finden Sie im NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Dokument-Nr. 1000000009513).

1. Melden Sie sich mit Ihrem Kennwort für Local Run Manager oder Illumina Run Manager beim NextSeq 550Dx an.
2. Wählen Sie im Startbildschirm der NOS-Software die Option **Sequence** (Sequenzieren).
3. Wählen Sie einen Lauf aus der Liste aus und wählen Sie anschließend **Next** (Weiter).  
Es öffnen sich Bildschirme für die Laufeinrichtung in der folgenden Reihenfolge: Load Flow Cell (Flusszelle laden), Load Buffer Cartridge (Pufferkartusche laden), Load Reagent Cartridge (Reagenzkartusche laden) und Pre-run Check (Vorlaufprüfung).

**HINWEIS** Die Läufe sind nur mit demselben Run Manager aufrufbar, der bei der Planung des Laufs verwendet wurde. Anweisungen zum Festlegen der Run Manager-Software finden Sie im Illumina Run Manager für NextSeq 550Dx Softwarehandbuch (Dokument-Nr. 200025239).

4. Wenn der Bildschirm „Load Flow Cell“ (Fließzelle laden) angezeigt wird, reinigen und laden Sie die Fließzelle.
  - Nehmen Sie die Fließzelle aus der Folienverpackung.
  - Öffnen Sie die transparente, aufklappbare Kunststoffverpackung und nehmen Sie die Fließzelle heraus.
  - Reinigen Sie die Glasoberfläche der Fließzelle mit einem fusselfreien Alkoholtupfer. Trocknen Sie das Glas mit einem fusselfreien Labortuch.
  - Vergewissern Sie sich, dass die Glasoberfläche der Fließzelle sauber ist. Wiederholen Sie gegebenenfalls den Reinigungsschritt.
  - Entfernen Sie die gebrauchte Fließzelle des vorherigen Laufs.
  - Richten Sie die Fließzelle über den Ausrichtungsstiften aus und legen Sie sie auf den Fließzellentisch.
5. Wählen Sie **Load** (Laden).  
Die Klappe wird automatisch geschlossen, die Fließzellen-ID wird angezeigt und die Sensoren werden überprüft.
6. Befolgen Sie die Anweisungen der Software, um den Behälter mit den verbrauchten Reagenzien zu leeren, laden Sie die NextSeq 550Dx-Pufferkartusche und die NextSeq 550Dx-Reagenzienkartusche.  
Wenn die NextSeq 550Dx-Pufferkartusche und -Reagenzienkartusche geladen sind, liest die Software die RFID ein. Die IDs der Pufferkartusche und der Reagenzienkartusche werden auf dem Bildschirm angezeigt und die Sensoren werden überprüft.
7. Wählen Sie nach Abschluss des automatisierten Selbsttests **Start** (Starten). (Nicht erforderlich, falls für automatischen Start konfiguriert.)
8. Wenn der Lauf beginnt, wird der Sequenzierungsbildschirm geöffnet. Dieser Bildschirm bietet eine visuelle Darstellung des aktuellen Laufs, einschließlich Intensitäten und Qualitäts-Scores (Q-Scores).

# Ergebnisse

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

## Demultiplexing

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

Index-Reads werden folgenderweise identifiziert:

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

## Generieren von FASTQ-Dateien

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

Jede FASTQ-Datei enthält nur die Reads einer Probe. Der Name der Probe ist Bestandteil des FASTQ-Dateinamens. Im Germline Variant Modul und im Somatic Variant Modul werden acht FASTQ-Dateien pro Probe pro Oligo-Pool generiert, vier aus Read 1 und vier aus Read 2. Diese Ausgabe führt zu insgesamt 8 bzw. 16 FASTQ-Dateien pro Probe bei Germline bzw. Somatic. FASTQ-Dateien sind die primären Eingabedateien für das Alignment.

## Alignment

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

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

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

- Read 1 wird anhand des umgekehrten Komplements der stromabwärts gelegenen lokusspezifischen Oligos (DLSO) beurteilt.
- Read 2 wird anhand der stromaufwärts gelegenen lokusspezifischen Oligos (ULSO) bewertet.
- Wenn der Beginn eines Reads maximal eine Nichtübereinstimmung gegenüber der Sondensequenz aufweist, wird die volle Länge des Reads mit dem Amplikonziel dieser Sequenz aligniert.
- Wenn der Beginn eines Reads mit einer Sondensequenz dahingehend übereinstimmt, dass er maximal drei Unterschiede (Nichtübereinstimmungen oder Verschiebungen aufgrund vorangehender Indels) aufweist, wird die volle Länge des Reads mit dem Amplikonziel dieser Sequenz aligniert.
- Indels innerhalb der DLSO und ULSO werden aufgrund der Assay-Chemie nicht beobachtet.

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

## Varianten-Calling

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

## Berichte und zusätzliche Ausgabedateien

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

## Verfahren zur Qualitätskontrolle

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

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

# Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale für das NextSeq 550Dx Gerät wurden unter Verwendung des Germline Variant Moduls und des Somatic Variant Moduls mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) ermittelt und mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bestätigt. Die Studien umfassten Probenindizierung, Probenverschleppung, DNA-Zugabe, analytische Sensitivität (Leerwertgrenze/Nachweisgrenze), Genauigkeit und Präzision sowie Methodenvergleich und Reproduzierbarkeit.

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

## Definitionen von Berechnungen, die bei Leistungsmerkmalen verwendet wurden

1. Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Varianten klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
  - $(\text{Anzahl der Varianten-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci})$   
Vom Assay gemeldete Varianten-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind richtig positive Werte (TP). Vom Assay als Referenz-Calls oder unterschiedliche Varianten-Calls gemeldete Varianten-Loci sind falsch negative Werte (FN).
2. Die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Wildtyp klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
  - $(\text{Anzahl der Wildtyp-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci})$   
Vom Assay gemeldete Wildtyp-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind richtig negative Werte (TN). Wildtyp-Loci, die vom Assay als Varianten gemeldet werden, sind falsch positive Werte (FP).
3. Die prozentuale Gesamtübereinstimmung (OPA) wird als der Anteil der Loci berechnet, die vom Assay in Bezug auf eine Referenzmethode korrekt gemeldet werden.
  - $((\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Varianten-Loci}) + (\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Wildtyp-Loci})) / ((\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci}) + (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci}))$
4. Die Berechnungen von PPA, NPA und OPA umfassen keine „No Calls“ (Varianten- oder Referenz-Loci, die einen oder mehrere Qualitätsfilter nicht passieren).

- Die Call-Rate der Autosomen wird als Gesamtzahl der Loci nach Filterung geteilt durch die Gesamtzahl der sequenzierten Positionen der Chromosomen 1–22 berechnet. Das X- und das Y-Chromosom werden nicht berücksichtigt. Diese Metrik berücksichtigt nicht die Übereinstimmung der Calls mit der Referenzmethode.

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

### Probenindizierung

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

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

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

### Probenverschleppung

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

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

Zur Untersuchung der Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurden zwei Bibliothekenpools vorbereitet und nacheinander auf einem NextSeq 550Dx Gerät sequenziert. Der erste Pool enthielt 46 Replikate der weiblichen Probe plus zwei Negativkontrollen. Der zweite Pool enthielt 46 Replikate der männlichen Probe plus zwei Negativkontrollen. In beiden Pools wurde derselbe Satz an Indexadaptern benutzt. Zuerst wurde der Pool aus weiblichen Proben sequenziert, dann folgte ein Sequenzierungslauf mit dem Pool aus männlichen Proben. Anschließend wurde ein erneuter Sequenzierungslauf mit dem Pool der weiblichen Proben durchgeführt. Die Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurde beurteilt, indem die Y-Chromosom-Amplikon-Coverage der entsprechenden Replikate des Wiederholungslaufs des Pools aus weiblichen Proben und des Laufs mit dem Pool aus männlichen Proben miteinander verglichen wurde. Die mittlere Verschleppung von Lauf zu Lauf betrug 0,0076 %.

## DNA-Zugabe

### Blut (Germline)

Für das NextSeq 550Dx Gerät wurde der DNA-Zugabebereich bei Blutproben für die Bibliotheksvorbereitung mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx mithilfe des Germline Variant Modul-Workflows bestimmt. Dieser Bereich wurde durch eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 13 Platinum Genome-Proben und einem repräsentativen Assay ausgewertet, der auf die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist. Die Bibliothek wurde auf zwei Exemplaren des NextSeq 550Dx Geräts mit einer Charge des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert.

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

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

DNA-Zugabe (ng)	Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100
12	Insertion	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Deletion	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

Tabelle 2 NPA für jede DNA-Zugabe

DNA-Zugabe (ng)	TN	FP	Referenz-No-Calls	NPA (%)
12	430.940	4	26	> 99,9
25	430.936	0	34	100
50	430.936	2	32	> 99,9
100	430.942	0	28	100
250	430.942	0	28	100

## FFPE (Somatic)

Für das NextSeq 550Dx Gerät wurde der DNA-Zugabebereich bei formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben für die Bibliotheksvorbereitung mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx mithilfe des Somatic Variant Modul-Workflows bestimmt. Hierzu wurde eine Studie zur seriellen Verdünnung mit drei Platinum Genome-Proben und einem repräsentativen Assay durchgeführt, der auf die Abfrage verschiedener Gene, die 12.588 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken, ausgelegt ist. Die Platinum Genome-Zelllinien GM12878 und GM12877 wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde die DNA extrahiert. GM12878 wurde mit GM12877 so verdünnt, dass die Variantenallelfrequenzen (VAFs) bei 79 Varianten (55 SNVs, 9 Insertionen und 15 Deletionen) annähernd 0,025, 0,05 oder 0,10 betragen. Darüber hinaus wies jede Probe 91 Varianten mit höheren Variantenfrequenzen bis zu einer VAF von 1,0 auf. Die Proben wurden je zweimal bei fünf DNA-Zugabestufen und gemäß den Messwerten des TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC Kit mit einem Delta der quantitativen Zyklen (dCq)-Mittelwert von 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 und 7,8 verarbeitet.

Jede Bibliothek wurde auf zwei Exemplaren des NextSeq 550Dx Geräts mit zwei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert. Für die Bestimmung der Genauigkeit wurden Proben-Variantencalls mit der Platinum Genomes-Version 2016-1.0 verglichen. Die PPA für jeden Variantentyp (SNVs, Insertionen und Deletionen) ist in [Tabelle 3](#) dargestellt. Die NPA ist in [Tabelle 4](#) dargestellt. Die empfohlene DNA-Zugabe für Varianten mit einer VAF von 0,05 oder höher beträgt  $dCq \leq 4$ , wobei 4,6 eine Untergrenze für die Erfüllung der Leistungsmerkmale darstellt.

Tabelle 3 PPA-Ergebnisse für die einzelnen DNA-Zugaben nach Variantentyp

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

Tabelle 4 NPA für jede DNA-Zugabe

dCq-Mittelwert	Erwarteter Wildtyp	Zielverdünnung VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referenz-No-Calls	NPA (%)	Referenz-No-Calls	NPA (%)	Referenz-No-Calls	NPA (%)
2,1	93.688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	> 99,9	3296	> 99,9	2996	100
7,8		3020	> 99,9	2880	> 99,9	2448	> 99,9

## Analytische Sensitivität (Leerwertgrenze [LoB] und Nachweisgrenze [LoD])

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

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

Tabelle 5 Leerwertgrenze

Variantentyp	Beobachtungen insgesamt	LoB Reagenziencharge 1 (%)	LoB Reagenziencharge 2 (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Insertion	504	0,56	0,56
Deletion	1008	1,20	1,20

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

Tabelle 6 Nachweisgrenze

Reagenziencharge	Variantentyp	Beobachtungen insgesamt	Anzahl der VAF-Messungen < 2,6 %	Prozentualer Anteil der VAF-Messungen < 2,6 %	Nachweisgrenze (%)
------------------	--------------	-------------------------	----------------------------------	---	--------------------

1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Insertion	420	6	1,4	5,08
	Deletion	840	7	0,8	5,22
2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Insertion	420	5	1,2	5,12
	Deletion	840	7	0,80	5,26

## Genauigkeit

### Germline

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

Tabelle 7 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Germline Variant Moduls

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

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

<sup>2</sup> Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikation über alle neun Läufe hinweg.

<sup>3</sup> Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

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

Tabelle 8 Germline-Übereinstimmung pro Probe

Probe	Mittlere Call-Rate	Erwartete Varianten <sup>1</sup>	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	4788	4788	0	0	756.762	0	100	100	100
NA12878	> 99,9	8505	8379	1	125	751.464	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12879	> 99,9	6048	5985	5	58	757.701	0	99,9	100	> 99,9
NA12880	> 99,9	6993	6930	0	63	757.638	0	100	100	100
NA12881	> 99,9	7875	7811	3	61	751.653	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	6300	6174	3	123	754.803	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	7119	7056	0	63	751.905	0	100	100	100
NA12884	> 99,9	7182	7119	6	57	754.146	0	99,9	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	7686	7560	2	124	754.173	0	> 99,9	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	7245	7182	7	56	752.469	0	99,9	100	> 99,9
NA12887	> 99,9	7119	7119	0	0	750.645	0	100	100	100
NA12888	> 99,9	6804	6804	0	0	756.065	0	100	100	100
NA12893	> 99,9	7434	7371	1	62	750.015	0	> 99,9	100	> 99,9

<sup>1</sup> Gesamtzahl der Varianten in allen Probenreplikaten über neun Läufe hinweg.

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

Tabelle 9 Germline-Übereinstimmung pro Probe nach Variantentyp

Probe	SNVs			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

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

Tabelle 10 Zusammenfassung der Germline-Indel-Erkennung

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

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

Tabelle 11 Genauigkeitsdaten auf Amplikon-Ebene des Germline Variant Moduls

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	76.167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), Indel	0,38	64.701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	74.529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	75.348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66.339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), Indel	0,39	57.330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), Indel	0,27	72.072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	73.710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	65.520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	N. z.	0,65	66.339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61.425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72.072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), Indel	0,31	71.253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), Indel	0,3	74.529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Indel	0,43	76.167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), Indel	0,42	59.787	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), Indel	0,27	74.823	0	1344	98,2

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
18	3	46620561	46620643	83	83	N. z.	0,43	67.977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), Indel	0,49	57.330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72.072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	60.543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63.882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79.443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	N. z.	0,29	63.882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), Indel	0,36	50.778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56.511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), Indel	0,27	50.778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	N. z.	0,78	61.425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68.796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	N. z.	0,39	52.416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), Indel	0,3	67.977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54.873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74.529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	61.425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83.538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	75.348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), Indel	0,61	76.608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	80.262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	77.805	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70.434	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), Indel	0,61	76.986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74.529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	N. z.	0,44	59.787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	72.072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71.253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	69.615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), Indel	0,62	73.710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), Indel	0,71	74.529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	N. z.	0,31	54.054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	76.167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	N. z.	0,42	67.977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), Indel	0,61	72.171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	54.873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80.262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	53.235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	N. z.	0,49	78.624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67.977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), Indel	0,68	79.443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), Indel	0,47	63.882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74.529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64.701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73.710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	77.805	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon- Beginn	Amplikon- Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon- Genominhalt	GC- Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), Indel	0,42	71.747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	N. z.	0,49	65.520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	N. z.	0,51	66.339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	N. z.	0,45	78.624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	57.330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	N. z.	0,65	81.900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	50.778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	N. z.	0,59	83.538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59.787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	N. z.	0,42	69.615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74.529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	69.615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	69.615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69.615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), Indel	0,52	68.796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76.167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	N. z.	0,49	66.339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58.149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77.805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	N. z.	0,52	59.787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), Indel	0,22	72.072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	72.891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	63.063	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54.873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	N. z.	0,25	67.977	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), Indel	0,19	58.642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	66.339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	74.529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54.054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	76.986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78.624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	55.692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), Indel	0,68	76.167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77.805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	58.149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	N. z.	0,36	74.529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	57.330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	N. z.	0,27	51.597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77.805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71.253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85.176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), Indel	0,37	74.529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72.891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), Indel	0,67	71.247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	74.529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	76.167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72.891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	66.343	27	788	98,8

Amplikon	Chromosom	Amplikon- Beginn	Amplikon- Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon- Genominhalt	GC- Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74.529	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	75.348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	64.413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70.434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68.796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54.873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	N. z.	0,37	74.529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56.511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), Indel	0,37	61.425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), Indel	0,47	66.339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), Indel	0,45	69.615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	N. z.	0,48	53.235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	N. z.	0,59	81.081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	N. z.	0,68	60.605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	N. z.	0,64	57.330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	N. z.	0,61	76.986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67.158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62.244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	57.330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	82.719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	54.873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72.072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	71.253	0	0	100

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	54.054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80.262	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), Indel	0,39	71.253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), Indel	0,32	56.439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73.710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	81.900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	N. z.	0,68	79.443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	79.443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	N. z.	0,6	81.081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	75.348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56.511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56.511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	N. z.	0,52	58.149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	N. z.	0,55	0	0	0	N. z.
149	Y	2655519	2655609	91	0	N. z.	0,48	0	0	0	N. z.
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	N. z.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe NA12878 wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (v2.19) festgelegt wurde. Von den 150 Amplikons befanden sich 92 Amplikons vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 41 Amplikons wiesen eine Teilüberlappung und 17 Amplikons keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 10.000 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse sind in [Tabelle 12](#) dargestellt.

Tabelle 12 Übereinstimmung der Ergebnisse des Germline Variant Moduls mit der NIST-Datenbank für Probe NA12878

Probe	Anzahl Amplikons	Mittlere Call-Rate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	> 99,9	6552	1	610.470	0	> 99,9	100	> 99,9

Die Daten aus den 9 Läufen der Studie mit dem Germline Variant Modul belegen, dass das NextSeq 550Dx Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- GC-Gehalt  $\geq 19$  % (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit 19 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,6 %)
- GC-Gehalt  $\leq 87$  % (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit 87 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- PolyA-Längen  $\leq 9$  (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einem PolyA-Repeat von neun Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- PolyT-Längen  $\leq 10$  (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einem PolyT-Repeat von zehn Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- PolyG-Längen  $\leq 7$  (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einem PolyG-Repeat von sieben Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 1,0 %)
- PolyC-Längen  $\leq 6$  (alle Base-Calls in 2457 sequenzierten Amplikons mit einem PolyC-Repeat von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)
- Längen von Dinukleotid-Repeats  $\leq 11$ -fach (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einem 11-fachen Dinukleotid-Repeat erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- Längen von Trinukleotid-Repeats  $\leq 5$ -fach (alle Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einem 5-fachen Trinukleotid-Repeat erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- Insertionslängen  $\leq 24$  (66.343 von 66.370 Base-Calls in 819 sequenzierten Amplikons mit einer Insertion aus 24 Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 1,2 %; in der Region mit der Insertion aus 24 Nukleotiden traten keine falschen Calls auf)
- Deletionslängen  $\leq 25$  (alle Base-Calls in 2457 sequenzierten Amplikons mit einer Deletion von 25 Nukleotiden erfolgten korrekt, ohne „No Calls“)

## Somatic

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

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

DNA der Probe GM12877 wurde mit DNA der Probe GM12878 zu GM12877-D5 und GM12877-D7 verdünnt, um eine Reihe von eindeutig heterozygoten Varianten mit Variantenfrequenzen von ca. 5 % bzw. 7 % zu erzeugen. Auf ähnliche Weise wurde DNA der Probe GM12878 mit DNA der Probe GM12877 verdünnt, um GM12878-D5 und GM12878-D7 zu erzeugen. Jede der Proben wurde dreifach getestet, mit Ausnahme der verdünnten Proben, die mit sechsfacher Wiederholung getestet wurden. Drei Bediener führten auf drei Sequenzierungsgeräten und mit drei Reagenzienchargen an fünf Starttagen insgesamt neun Läufe durch. Die Genauigkeit für SNV, Insertionen und Deletionen wurde untersucht, indem die Ergebnisse mit einer gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode, Platinum Genomes Version 2016-1.0, verglichen wurden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Definition der genomischen Regionen anhand dieser Referenzmethode.

Tabelle 13 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Somatic Variant Moduls

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

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

<sup>2</sup> Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikation über alle neun Läufe hinweg.

<sup>3</sup> Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

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

Tabelle 14 Übereinstimmung des Somatic Variant Moduls pro Probe

Probe	Mittlere Call-Rate	Erwartet	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318.682	15	100	> 99,9	> 99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317.645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323.614	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322.038	5	100	> 99,9	> 99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322.121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323.048	2	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630.621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629.719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628.582	0	99,5	100	> 99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629.803	0	100	100	100

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

Tabelle 15 Übereinstimmung des Somatic Variant Moduls nach Variantentyp

Probe	SNVs			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

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

Tabelle 16 Zusammenfassung der Indel-Erkennung des Somatic Variant Moduls

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

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

Tabelle 17 Genauigkeitsdaten auf Amplikon-Ebene des Somatic Variant Moduls

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	35.066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), Indel	0,38	29.827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	34.202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	34.613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30.571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), Indel	0,39	26.452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA(3), Indel	0,27	33.148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	33.928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	30.218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	N. z.	0,65	30.616	0	2	> 99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28.017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33.207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), Indel	0,31	32.524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), Indel	0,3	33.972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	N. z.	0,43	35.051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), Indel	0,42	27.459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), Indel	0,27	34.534	0	620	98,2

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
18	3	46620561	46620643	83	83	N. z.	0,43	31.339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), Indel	0,49	26.373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32.829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	27.925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29.327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36.585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	N. z.	0,29	29.427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), Indel	0,36	23.356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25.942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), Indel	0,27	22.944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	N. z.	0,78	28.299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31.658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	N. z.	0,39	24.120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), Indel	0,3	31.297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25.277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34.308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	28.266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38.489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	34.730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), Indel	0,61	35.057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	36.647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	35.681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32.438	0	70	99,8

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), Indel	0,61	35.441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34.354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	N. z.	0,44	27.575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	33.060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32.423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	32.074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), Indel	0,62	33.791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), Indel	0,71	34.316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	N. z.	0,31	24.901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	35.067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	N. z.	0,42	31.365	0	9	> 99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC (4), Indel	0,61	32.781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	25.228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36.968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	24.472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	N. z.	0,49	36.203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31.329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), Indel	0,68	36.472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), Indel	0,47	29.473	0	11	> 99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34.188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29.843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33.968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	35.829	0	81	99,8

Amplikon	Chromosom	Amplikon- Beginn	Amplikon- Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon- Genominhalt	GC- Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), Indel	0,42	32.098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	N. z.	0,49	30.217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	N. z.	0,51	30.531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	N. z.	0,45	36.105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	26.318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	N. z.	0,65	37.785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	23.368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	N. z.	0,59	38.546	0	10	> 99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27.516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	N. z.	0,42	32.083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34.047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	32.065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), Indel	0,34	32.083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32.103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), Indel	0,52	31.645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34.824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	N. z.	0,49	30.497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26.773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35.830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	N. z.	0,52	27.498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), Indel	0,22	32.824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	33.574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	29.075	0	31	99,9

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25.313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	N. z.	0,25	31.360	0	22	99,9
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), Indel	0,19	26.499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	30.494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	34.313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24.555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	35.472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36.264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	25.667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), Indel	0,68	34.745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35.870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	26.762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	N. z.	0,36	34.286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	26.449	0	11	> 99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	N. z.	0,27	23.809	0	5	> 99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35.860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32.835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39.177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), Indel	0,37	34.075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33.632	0	11	> 99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), Indel	0,67	32.752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	34.343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	35.077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33.553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), Indel (x2)	0,29	30.554	53	2296	92,9

Amplikon	Chromosom	Amplikon- Beginn	Amplikon- Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon- Genominhalt	GC- Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34.360	0	38	99,9
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), Indel	0,26	34.367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	29.751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32.176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31.604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25.273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	N. z.	0,37	34.386	0	12	> 99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25.692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), Indel	0,37	27.923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), Indel	0,47	30.598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), Indel	0,45	31.969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	N. z.	0,48	24.531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	N. z.	0,59	37.298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	N. z.	0,68	27.881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	N. z.	0,64	26.442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	N. z.	0,61	35.501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30.951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28.686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), Indel	0,46	26.372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	38.159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	25.188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32.969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	32.818	0	77	99,8

Amplikon	Chromosom	Amplikon-Beginn	Amplikon-Ende	Größe des analysierten Fragments	Basen in zuverlässigen Regionen	Amplikon-Genominhalt	GC-Gehalt	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	24.758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36.902	0	160	99,6
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), Indel	0,39	32.841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), Indel	0,32	25.939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33.942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	37.733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	N. z.	0,68	36.617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	36.525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	N. z.	0,6	37.398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	34.754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26.046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26.019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	N. z.	0,52	26.780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	N. z.	0,55	0	0	0	n. z.
149	Y	2655519	2655609	91	0	N. z.	0,48	0	0	0	n. z.
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	n. z.

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

**Tabelle 18** Übereinstimmung der Ergebnisse des Somatic Variant Moduls mit der NIST-Datenbank für Probe GMT12878

Probe	Anzahl Amplikons	Mittlere Call-Rate	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258.488	0	100	100	100

Die Daten aus den 9 Läufen der Somatic-Studie belegen, dass das NextSeq 550Dx Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- GC-Gehalt  $\geq 19$  % (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit 19 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 2,6 %)
- GC-Gehalt  $\leq 87$  % (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit 87 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,6 %)
- PolyA-Längen  $\leq 9$  (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einem PolyA-Repeat von neun Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 2,5 %)
- PolyT-Längen  $\leq 10$  (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einem PolyT-Repeat von 10 Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von unter 0,1 %)
- PolyG-Längen  $\leq 6$  (alle Base-Calls in 2268 sequenzierten Amplikons mit einem PolyG-Repeat von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,5 %)
- PolyC-Längen  $\leq 6$  (alle Base-Calls in 756 sequenzierten Amplikons mit einem PolyC-Repeat von sechs Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,4 %)
- Längen von Dinukleotid-Repeats  $\leq 4$ -fach (alle Base-Calls in 1890 sequenzierten Amplikons mit einem 4-fachen Dinukleotid-Repeat erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,9 %)
- Längen von Trinukleotid-Repeats  $\leq 5$ -fach (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einem 5-fachen Trinukleotid-Repeat erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 1,4 %)
- Insertionslängen  $\leq 23$  (alle Base-Calls in 378 sequenzierten Amplikons mit einer Insertion von 23 Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,8 %)
- Deletionslängen  $\leq 25$  (alle Base-Calls in 1134 sequenzierten Amplikons mit einer Deletion von 25 Nukleotiden erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,7 %)

## Präzision

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

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

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

## Methodenvergleich (Sequenzierungsplattform)

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

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

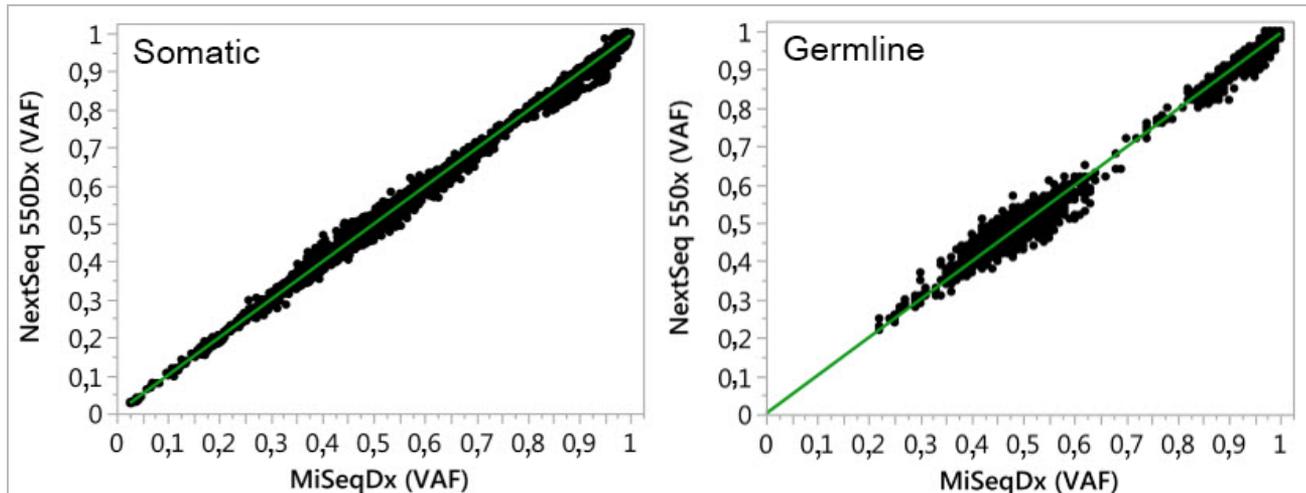


Tabelle 20 Ergebnisse des Methodenvergleichs mit eindeutigen Blut- und FFPE-Proben

gDNA-Quelle	Assay (Oligo-Panel)	Biologische Replikate (Proben)	Technische Replikate (pro Probe)	Beobachtungen (Anzahl der Varianten)	Steigungswert	Achsenabschnitt	Korrelation (R <sup>2</sup> )
Blut	Assay 1	45	2	8369 <sup>1</sup>	0,992	0,002	0,995 <sup>2</sup>
Blut	Assay 2	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	Assay 1	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 <sup>2</sup>
FFPE	Assay 3	40	1	280	0,969	0,015	0,978

<sup>1</sup> Zwei Datenpunkte wurden aufgrund der für das Germline Variant Modul angegebenen Einschränkungen entfernt.

<sup>2</sup> Determinationskoeffizient der VAF-Diagramme, wie in Abbildung 2 dargestellt.

## Reproduzierbarkeit

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

Die Tests wurden an drei externen Standorten mit einer Charge des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) durchgeführt. An jedem Standort wurde ein NextSeq 550Dx Gerät verwendet. An jedem Standort führten zwei Bediener die Tests durch. Jeder der Bediener führte die Tests an drei nicht aufeinanderfolgenden Starttagen für alle Probentypen durch. Es wurden also an den drei Standorten insgesamt 36 Läufe durchgeführt, davon jeweils 18 Läufe für den Germline- und für den Somatic-Workflow.

## Germline

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

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

Variantentyp	No Call			Korrekt positiver Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110.376	0,014	110.349	110.360	99,99	99,98	99,99
Insertionen	1026	37.044	2,77	36.018	36.018	100	99,99	100,00
Deletionen	648	34.776	1,86	34.128	34.128	100	99,99	100,00

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

Tabelle 22 Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Call			Korrekt negativer Call				
	Beobachtet	Summe	Prozent	Beobachtet	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
Wildtyp	4883	19.600.182	0,025	19.595.299	19.595.299	100	100,00	100,00

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

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

Tabelle 23 Keimbahn-Cx-Werte für heterozygote Varianten

Variantentyp	Cutoff bei 0,2 VAF	Cutoff bei 0,7 VAF
	≥ C99,999 %	≤ C0,001 %
SNV	94/94	94/94
Insertionen	24/24	24/24
Deletionen	35/35	35/35
Summe	153	153

## Somatisch

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Somatische Varianten mit einem VAF-Wert von  $< 0,01$  werden als negative Calls (Wildtyp) gemeldet. Für erwartete negative somatische Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und korrekte Wildtyp-Call-Raten hin ausgewertet. Korrekte Wildtyp-Calls wurden ermittelt, indem die „No Calls“ ausgeschlossen und die beobachteten Calls, die in den mehrdeutigen Bereich (VAF-Werte  $\geq 0,01$  und  $< 0,026$ ) fielen, sowie die falschen Calls, die über dem Schwellenwert (VAF-Werte  $\geq 0,026$ ) lagen, von der Gesamtsumme subtrahiert wurden.

Tabelle 27 führt die beobachteten Gesamt- und prozentualen Ergebnisse für negative somatische Positionen für die No-Call-Rate und die Call-Rate korrekter Wildtypen auf, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 27 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete negative Ergebnisse

Variante Typ	No Call			Korrekt positiver Call						
	Beobachtet	Summe	Prozent	Mehrdeutig	Falsch	Richtig	Summe	Prozent	95 % LCL	95 % UCL
Wildtyp	36.326	8.909.676	0,408	2254	121	8.870.975	8.873.350	99,97	99,972	99,974

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

Tabelle 28 C95 für somatische Varianten – Übersicht

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

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

## Überblick

Das NextSeq 550Dx ist mit zwei Reagenzien-Kits kompatibel: dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen). Zum Nachweis, dass das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) verifizierten und validierten Anforderungen an die analytische Leistung erfüllt, wurden Studien mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) durchgeführt. Es wurden zwei Bibliotheksvorbereitungen mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx durchgeführt, eine mit dem Workflow für das Germline Variant Modul und die andere mit dem Workflow für das Somatic Variant Modul. Bibliotheken aus beiden Workflows wurden mit drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) und drei NextSeq 550Dx Geräten getestet. Darüber hinaus umfassten die Tests für beide Workflows einen Einzellauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen).

## Analytische Sensitivität (Leerwertgrenze [LoB] und Nachweisgrenze [LoD])

Die Verifizierung mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) hat gezeigt, dass das NextSeq 550Dx Gerät Varianten bei 0,05 VAF mit einem Fehler zweiter Art  $\leq 0,05$  erkennt und dass mit dem vom Somatic Variant Modul (effektive LoB) verwendeten VAF-Schwellenwert von 0,026 ein Fehler erster Art  $\leq 0,01$  erreicht wird. Ausgehend von diesen Angaben ist zu erwarten, dass eine Variante bei einer VAF von 0,05 in 95 % der Fälle eine VAF von 0,026 oder höher aufweist und dass eine Wildtyp-Position in 99 % der Fälle eine VAF von unter 0,026 aufweist. Um sicherzustellen, dass diese Angaben mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erreicht werden, wurden auf dem NextSeq 550Dx Gerät wiederholte Messungen mit Wildtyp-Proben (LoB-Proben) und mit Proben, die Varianten mit einer VAF von 0,05 enthalten (LoD-Proben), unter Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) durchgeführt. Der Anteil der Calls über und unter dem Schwellenwert von 0,026 wurde dann mit den Angaben verglichen, die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) ermittelt wurden.

Die Tests umfassten zwei LoD-Proben mit jeweils einem eindeutigen, auf eine VAF von 0,05 untersuchten Variantensatz und entsprechende LoB-Proben, die die untersuchten Varianten als Wildtyp enthielten. Für die Bibliotheksvorbereitung wurden die LoD- und LoB-Proben in acht bzw. sieben Replikaten mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx verarbeitet. Die Bibliotheken wurden zunächst mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sequenziert, um Varianten/genomische Koordinaten für die LoB-/LoD-Untersuchung mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) zu ermitteln. Alle Varianten mit einer mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) ermittelten durchschnittlichen VAF zwischen 0,045 und 0,055 (LoD-Varianten) wurden für die LoD-Analyse verwendet (N = 51 Varianten). Für die LoB-Analyse wurden die 51 entsprechenden genomischen Koordinaten ausgewertet.

Für die Evaluierung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) wurden die Bibliotheken in drei Läufen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit demselben Gerät und derselben Charge des Reagenzien-Kits sequenziert. Diese Tests umfassten 24 Replikate aller 51 LoD-Varianten und 21 Replikate aller

entsprechenden Wildtyp-Positionen. Der Anteil der Wildtyp-Calls mit einer VAF < 0,026 ist in [Tabelle 29](#) angegeben. Der Anteil der LoD-Varianten-Calls mit einer VAF größer oder gleich 0,026 ist in [Tabelle 30](#) angegeben.

Tabelle 29 Anteil der Calls < 0,026 für Wildtyp-Positionen (Auswertung der LoB-Angaben)

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

Tabelle 30 Anteil der Calls mit einer VAF  $\geq 0,026$  für LoD-Varianten (Auswertung der LoD-Angaben)

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

## Genauigkeit

### Germline

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Genauigkeit des Varianten-Callings zu untersuchen, die mit dem Germline Variant Modul bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erzielt werden kann. Zwölf eindeutige Platinum Genome-Proben wurden mit einem repräsentativen Assay getestet. Es wurden insgesamt 11 Läufe mit drei Exemplaren des NextSeq 550Dx Geräts und drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) durchgeführt.

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

Tabelle 31 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Germline Variant Moduls

Kriterien	Beobachtungen insgesamt (v2.5) <sup>1</sup>	Ergebnis nach Beobachtung (v2.5) <sup>2</sup>	Ergebnis nach Beobachtung (v2) <sup>3</sup>	Ergebnis nach Lauf (v2.5) <sup>4</sup>	Ergebnis nach Lauf (v2) <sup>4</sup>
PPA für SNV	1056	98,7	98,7	> 99,9	> 99,9

Kriterien	Beobachtungen insgesamt (v2.5) <sup>1</sup>	Ergebnis nach Beobachtung (v2.5) <sup>2</sup>	Ergebnis nach Beobachtung (v2) <sup>3</sup>	Ergebnis nach Lauf (v2.5) <sup>4</sup>	Ergebnis nach Lauf (v2) <sup>4</sup>
PPA für Insertionen	1056	100	100	100	100
PPA für Deletionen	1056	95,2	95,2	> 99,9	> 99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	> 99,9	> 99,9	> 99,9	> 99,9

<sup>1</sup> Berechnet als Anzahl der Proben pro Lauf x Anzahl der Läufe (96 Proben pro Lauf x 11 Läufe = 1056 Beobachtungen).

<sup>2</sup> Niedrigster beobachteter Wert pro Probenreplikat über alle Läufe (für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 basierend auf 11 Läufen).

<sup>3</sup> Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikation in einem Lauf (96 Beobachtungen insgesamt).

<sup>4</sup> Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

## Somatic

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Genauigkeit des Varianten-Callings zu untersuchen, die mit dem Somatic Variant Modul auf dem NextSeq 550Dx Gerät bei Verwendung des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) erzielt werden kann. Zehn Platinum Genome-FFPE-Proben (zwei davon mit auf eine VAF von 0,05 verdünnten Varianten) wurden mit einem repräsentativen Assay getestet. Es wurden insgesamt 11 Läufe mit drei Exemplaren des NextSeq 550Dx Geräts und drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) durchgeführt.

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

Tabelle 32 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Somatic Variant Moduls

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

<sup>1</sup> Berechnet als Anzahl der Proben pro Lauf x Anzahl der Läufe (48 Proben pro Lauf x 11 Läufe = 528 Beobachtungen).

<sup>2</sup> Niedrigster beobachteter Wert pro Probenreplikat über alle Läufe (für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 basierend auf 11 Läufen).

<sup>3</sup> Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikation in einem Lauf (96 Beobachtungen insgesamt).

<sup>4</sup> Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

## Präzision

### Germline

Die Präzision des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bei Verwendung mit dem Germline Variant Modul wurde anhand von Platinum Genome-Proben und einem repräsentativen Assay ermittelt. Die Tests bestanden aus einer einzigen Bibliotheksvorbereitung mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und umfassten 12 Proben, die mit jeweils acht Replikaten verarbeitet wurden. Es wurden Bibliotheken in insgesamt neun Sequenzierungsläufen mit drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) und drei Exemplaren des NextSeq 550Dx Gerät sequenziert.

Es wurden Proben mit heterozygoten Varianten verwendet, um zu ermitteln, ob die inhärente Variabilität des Assays den Genotypaufruf beeinflusst (N = 153 eindeutige heterozygote Varianten). Der Cx-Wert wurde für beide Germline Variant Modul-Schwellenwerte (0,2 für heterozygote und 0,7 für homozygote Genotypen) bestimmt, wobei x für den Anteil der wiederholten Tests steht, die den Schwellenwert überschreiten. Für den unteren Schwellenwert von 0,2 VAF wurde für die Variante mit dem minimalen Cx für das NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) ein Wert von > 99,9 % ermittelt. Das bedeutet, dass > 99,9 % der heterozygoten Varianten beim Calling als heterozygot erkannt würden. Für den oberen Schwellenwert von 0,7 VAF wurde für die Variante mit dem maximalen Cx für das NextSeq 550Dx Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) ein Wert von < 1,5 % ermittelt. Das bedeutet, dass ≤ 1,5 % der heterozygoten Varianten beim Calling als homozygot erkannt würden. [Tabelle 33](#) fasst die Ergebnisse nach Variantentyp zusammen. Die Cx-Werte aus dem einzelnen Sequenzierungslauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) werden als Referenz angegeben.

Tabelle 33 Keimbahn-Cx-Werte für heterozygote Varianten

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

<sup>1</sup> Cx-Werte auf Basis von Schätzungen der Gesamtstandardabweichung aus der Varianzkomponentenanalyse.

<sup>2</sup> Cx-Werte auf Basis der Standardabweichungen der Proben.

### Somatic

Die Präzision des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) bei Verwendung mit dem Somatic Variant Modul wurde anhand von Platinum Genome-FFPE-Proben und einem repräsentativen Assay ermittelt. Die Tests bestanden aus einer einzigen Bibliotheksvorbereitung mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit Dx und umfassten zwei Proben mit jeweils acht Replikaten. Es wurden Bibliotheken in insgesamt neun Sequenzierungsläufen mit drei Chargen des NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) und drei Exemplaren des NextSeq 550Dx Geräts sequenziert.

Somatische Varianten mit erwarteten VAF-Werten  $\leq 0,10$  VAF (N = 131 eindeutige Varianten) wurden zur Bewertung der Gerätevariabilität in der Nähe des VAF-Schwellenwerts des Somatic Variant Moduls verwendet. (Somatische Varianten mit einem VAF-Wert  $\geq 0,026$  gelten als positiver Varianten-Call.) Die C95-Werte wurden für alle somatischen Varianten bestimmt. C95-Werte geben die VAF an, bei der die Wahrscheinlichkeit eines Überschreitens des VAF-Schwellenwerts des Somatic Variant Moduls 95 % beträgt. Die höchsten C95-Werte sind nach Variantenart in [Tabelle 34](#) aufgeführt. Die C95-Ergebnisse aus einem einzelnen Sequenzierungslauf mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) sind als Referenz angegeben.

Tabelle 34 C95 für somatische Varianten – Übersicht

Variantentyp	Anzahl der ausgewerteten Varianten	C95 (v2.5) <sup>1</sup>	C95 (v2) <sup>2</sup>
SNV	74	0,064	0,063
Insertionen	24	0,062	0,061
Deletionen	33	0,060	0,060

<sup>1</sup> C95-Werte auf Basis von Schätzungen der Gesamtstandardabweichung aus der Varianzkomponentenanalyse.

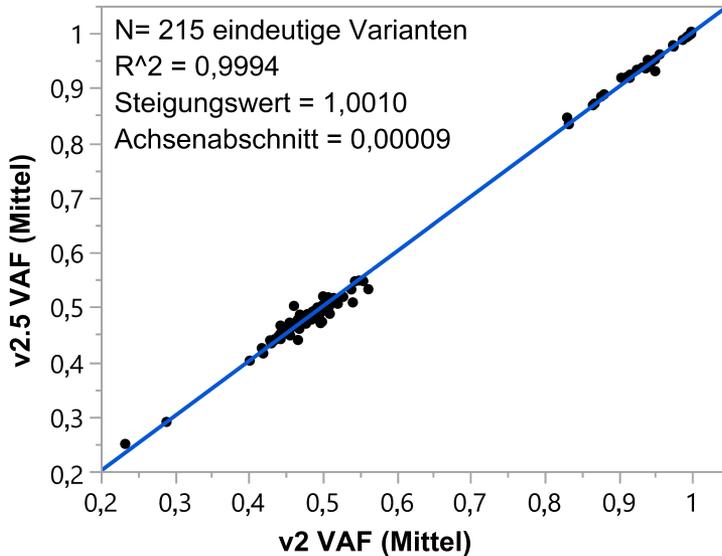
<sup>2</sup> C95-Werte auf Basis der Standardabweichungen.

## Methodenvergleich (Reagenzien-Kit)

### Germline

Die durchschnittlichen VAFs von 215 eindeutigen Varianten wurden für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) anhand von mit dem Germline Variant Modul generierten Ergebnissen ausgewertet. Die VAF-Durchschnittswerte wurden aus 11 Sequenzierungsläufen (v2.5) und einem Sequenzierungslauf (v2) gebildet. Die Berechnung der Durchschnittswerte erfolgte anhand von mindestens acht Replikaten pro Variante. [Abbildung 3](#) stellt die Korrelation der VAF der beiden Reagenzien-Kits dar. Ausgehend von der starken linearen VAF-Korrelation und der Ähnlichkeit der mit den beiden Reagenzien-Kits generierten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die ursprünglich mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem Germline Variant Modul verifizierten und validierten Leistungsmerkmale auch für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) gelten.

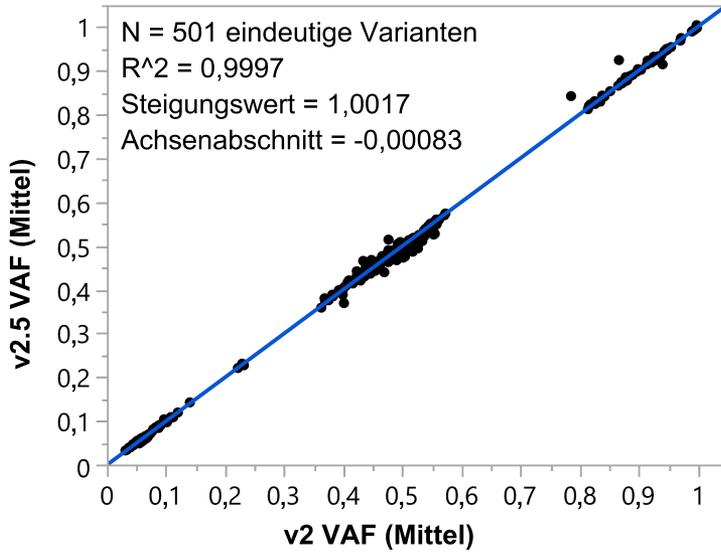
Abbildung 3 Korrelation der mit dem Germline Variant Modul bestimmten Variantenallelfrequenz (VAF) zwischen dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen).



## Somatic

Die durchschnittlichen VAFs für 501 eindeutige Varianten wurden für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) anhand von mit dem Somatic Variant Modul generierten Ergebnissen ausgewertet. Die VAF-Durchschnittswerte wurden aus 11 Sequenzierungsläufen (v2.5) und einem Sequenzierungslauf (v2) gebildet. Die Berechnung der Durchschnittswerte erfolgte anhand von mindestens drei Replikaten pro eindeutiger Variante. [Abbildung 4](#) stellt die Korrelation der VAF der beiden Reagenzien-Kits dar. Ausgehend von der VAF-Korrelation und der Ähnlichkeit der mit den beiden Reagenzien-Kits generierten Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die mit dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem Somatic Variant Modul verifizierten und validierten Leistungsmerkmale auch für das NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) gelten.

Abbildung 4 Korrelation der mit dem Somatic Variant Modul bestimmten Variantenallelfrequenz (VAF) zwischen dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) und dem NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen).



## Versionsverlauf

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200031448 v00	Juni 2023	<p>Erste Version. Vorheriges Dokument 1000000030326 wurde durch dieses ersetzt. Änderungen von Dokument 1000000030326 v6 an diesem neuen Dokument:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhalt zur Unterstützung des optionalen Illumina DRAGEN Server für NextSeq 550Dx ergänzt.</li> <li>• Luftfilter-Teilenummer aktualisiert.</li> </ul> <p>Vorangegangene Änderungen an Dokument 1000000030326:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Versehentlich hinzugefügte Inhalte aus der Quellensoftware entfernt.</li> <li>• Warn- und Vorsichtshinweise bezüglich der Meldung schwerwiegender Vorfälle hinzugefügt.</li> <li>• Erklärung hinsichtlich vorgesehener Anwender zu den Verfahrensprinzipien hinzugefügt.</li> <li>• Verweis auf das High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen) entfernt.</li> <li>• Verweis auf das High Output Reagent Kit v2.5 (75 Zyklen) hinzugefügt.</li> <li>• Tabelle mit Versionshistorie hinzugefügt. Adresse der autorisierten europäischen Vertretung aktualisiert.</li> </ul>

## Patente und Marken

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

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

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

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

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformationen



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



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

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

## Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte „*Documentation*“ (Dokumentation) für Ihr Kit.