

Indlægsseddel

TIL IN VITRO DIAGNOSTISK BRUG.

Erklæret formål

TruSight™ Whole Genome er udstyr til kvalitativ *in vitro*-diagnostik beregnet til helgenomsekventering og påvisning af enkelt-nukleotidvarianter, insertioner/sletninger, kopiantalvarianter, kørsler af homozygositet, korte tandem-gentagelsesekspansioner og mitokondrievariationer i humant genomisk DNA ekstraheret fra blod.

TruSight Whole Genome omfatter TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes og TruSight Whole Genome Analysis Application-softwaren. Udstyret er beregnet til brug med kompatible nedstrøms kimcelleapplikationer til udvikling af *in vitro*-diagnostiske analyser og af kvalificeret laboratoriepersonale og analyseudviklere.

TruSight Whole Genome er beregnet til brug på NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Oversigt og forklaring

TruSight Whole Genome er en analyse til næste generations sekventering, der bruger tagmenteringsbaseret PCR-fri biblioteksklargøring, startende fra genomisk DNA (gDNA) ekstraheret fra humant perifert fuldblod, og sekventering og primær analyse på Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundær analyse udføres med TruSight Whole Genome Analysis Application-softwaren på den inkluderede og påkrævede Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx og omfatter demultipleksering, justering til GrCh38/hg38 humant referencegenom og variantbestemmelse samt annotering og anvendelse af målingsspecifikationer for kvalitetskontrol (QC) i [Tabel 1](#) for at sikre analytisk ydeevne. Analyseoutputtet omfatter kørsels- og prøve-QC-rapporter og genomets variantbestemmelsesformat (VCF)-filer til brug med kompatibel nedstrøms tertiær analyse- og rapporteringssoftware.

TruSight Whole Genome giver en bred vurdering af genomiske varianter på tværs af kodnings- og ikke-kodningsområder af det humane genom. Variantvurdering omfatter påvisning af små varianter, kopinummervarianter (CNV'er), kørsler af homozygositet (ROH) og korte tandemgentagelsesekspansioner (STR). Desuden detekterer TruSight Whole Genome fraværet af SMN1 c.840C-allelen (NM_000344.3:c.840C>T), hvilket kan indikere SMN1-gensletning eller SMN1/SMN2-genkonvertering.^{1,2} Biallelisk tab af SMN1 c.840C-allelen er ansvarlig for ca. 95 % af tilfældene af spinal muskeltrofi (SMA).³

[Tabel 2](#) tilvejebringer oplysninger om varianttyperne, der er valideret med TruSight Whole Genome.

Tabel 1 TruSight Whole Genome-specifikationer for kvalitetsmåling

Outputtype	Måling	Specifikation
QC af sekventeringskørsel	Samlet % \geq Q30	\geq 85,0

Outputtype	Måling	Specifikation
FASTQ QC	Resultat pr. prøve (bps)	≥ 90.000.000.000
QC af prøvebibliotek	Gennemsnitlig autosomal dækning	≥ 35,0
	Procentdel af autosomer med mere end 20X dækning	≥ 93,94
	Normaliseret dækning ved 60 % til 79 % GC-beholdere	0,82 ≤ x ≤ 1,13
	Normaliseret dækning ved 20 % til 39 % GC-beholdere	0,97 ≤ x ≤ 1,06
	Gennemsnitlig mitokondriedækning	≥ 500,0
	Procentdel Q30-baser	≥ 85,0
	Estimeret prøvekontaminering	≤ 0,005

Tabel 2 Påviste varianter valideret med TruSight Whole Genome

Varianttype	Valideret variantpåvisning
Små varianter	Enkelt nukleotidvarianter (SNV'er), korte indsættelser/sletninger (1-31 bp)
Kopinummervarianter (CNV'er)	≥ 10 kb gevinster og tab
Kørslers af homozygositet (ROH)	≥ 500 kb
Mitokondrie-SNV'er	% heteroplasmie hvis ≥ 4,75 %
Korte tandemgentagelsesekspansioner (STR)	Målerettede loci (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B og TBP)
SMN1-variant	NM_000344.3:c.840C/T

Procedurens principper

TruSight Whole Genome er beregnet til klargøring af PCR-fri biblioteker til fremstilling af humane helgenomsekventeringsdata. Analysen begynder med klargøring af biblioteker fra kvantificeret genomisk DNA, der er ekstraheret fra humant perifert fuldblod, omfatter sekventering og analyse på NovaSeq 6000Dx Instrument ved hjælp af TruSight Whole Genome Analysis Application og slutter med variantbestemmelse og -annotering.

Analyseproceduren for TruSight Whole Genome består af følgende trin:

- **Batchplanlægning og kørselsoprettelse** – Det anbefales på det kraftigste at planlægge batchen og kørslerne, inden klargøring af biblioteket påbegyndes. Der kan klargøres op til 24 prøvebiblioteker i en biblioteksklargøringsbatch. Baseret på antallet af prøver kan der anvendes forskellige flowcellekonfigurationer (6-plex på S2 og 16-plex på S4). Biblioteks-ID, prøvenavne og tilsvarende

indeksering registreres under kørselsplanlægning og kørselsoprettelse. For yderligere oplysninger om kørselsoprettelse henvises til Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931). Følg den planlagte batch under udførelse af arbejdsgangen for biblioteksklargøring.

- **Klargøring til protokol** – Nogle reagenser er frosne og skal bringes til stuetemperatur. På grund af den korte arbejdsgang er det muligt at fuldføre klarføringen og starte sekventeringen samme dag. Derfor kan sekventeringsforbrugsstoffer til planlagte kørsler også optøs under dette trin. Kvantificerede genomiske DNA-prøver optøs og fortyndes for optimeret DNA-input.
- **Biblioteksklargøring**
 - **Tagmentering af genomisk DNA** – Bruger Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) til at tagmentere DNA-inputtet. Under tagmentering er gDNA fragmenteret, mærket med adaptore og immobiliseret på overfladen af magnetiske BLT-PF perler.
 - **Oprensning efter tagmentering** – Renser det adaptermærkede DNA på BLT-PF og fjerner stopbuffer for at forberede sig på ligering af indekser.
 - **Ligering af indekser** – Tilføjer unikke dobbeltindekser til biblioteker for at aktivere multipleksing. Udfører mellemrumsudvidelse, og eluerer enkeltstrengede DNA-biblioteker af perler.
 - **Størrelsesvalg og oprydning af biblioteker** – En perlerensningsprocedure med dobbeltsidet størrelsesvalg fjerner fragmenter, der er for små og for store til at gå målrettet efter en median fragmentlængde på ca. 450 bp, område ~360 til 550 bp.
 - **Puljedannelse og denaturering af biblioteker** – Selvnormaliseringsfunktionen iBLT-PF gør det muligt at pulje efter volumen uden qPCR eller anden normalisering. Det angivne volumen for hvert bibliotek samles i henhold til planen for hver kørsel og denatureres med 0,2N NaOH (fortyndet HP3). Den denaturerede pulje overføres derefter til NovaSeq 6000Dx-biblioteksrøret med det ID, der svarer til den planlagte kørsel.
- **Sekventering og analyse** – Forbrugsstoffer i S2- og/eller S4-konfigurationen indlæses i NovaSeq 6000Dx Instrument, herunder de(t) tilknyttede NovaSeq 6000Dx biblioteksrør med samlede biblioteker. Ved indlæsning scannes biblioteksrør-ID'et, og hvis det indtastes under kørselsplanlægningen, bruges det til at vælge den tilsvarende planlagte kørsel. Ellers skal den tilknyttede planlagte kørsel vælges manuelt. Samlede biblioteker samles i klynger på en flowcelle og sekventeres ved hjælp af sekventering ved syntese-kemi (SBS) på NovaSeq 6000Dx. SBS-kemien anvender en reversibel terminator-metode til at påvise fluorescensmærkede enkeltnukleotidbaser, når de inkorporeres i voksende DNA-streng. Real-Time Analysis (RTA)-software udfører primær analyse, der omfatter basebestemmelse og tildeling af en kvalitetsscore til hver basebestemmelse. Primære analysedata overføres automatisk til Illumina DRAGEN-serveren.
Demultipleksing og DRAGEN-analyse udføres automatisk ved hjælp af TruSight Whole Genome Analysis Application. Som en del af denne analyse gennemgås hver kørsel og hvert prøvebibliotek for validitet ved hjælp af analytiske målinger beskrevet i [Kvalitetskontroller på side 31](#), og resultaterne vises i konsoliderede og individuelle prøverapporter. For gyldige prøvebiblioteker genereres annoterede genomvariantbestemmelsesformatfiler (VCF). For yderligere oplysninger om analysearbejdsgangen henvises til Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Procedurens begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- TruSight Whole Genome er kompatibel med genomisk DNA afledt af humant perifert fuldblod.
- Analysen inkluderer ikke reagenser til DNA-ekstraktion eller -kvantificering. De analytiske testresultater, herunder [Interfererende stoffer på side 36](#), er opnået med fuldblod ved hjælp af repræsentative DNA-ekstraktionssæt og DNA-kvantificeringssæt. Alle diagnostiske test, der bliver udviklet til brug sammen med TruSight Whole Genome, kræver fuld validering med hensyn til alle ydeevneaspekter med DNA-ekstraktion og de valgte sæt til DNA-kvantificering.
- Analysen er blevet konfigureret og testet for den prøvepleksitet og de indekssæt, der er angivet i følgende tabel.

Batchstørrelse til biblioteksklargøring	Pleksitet	Kørselskonfiguration	Indeksring
6, 12, 18 eller 24 prøver	6-plex	1-4 S2 kørsler	S2-sæt 1 til 4
16 prøver	16-plex	1 S4 kørsel	S4-sæt 1 eller 2
22 prøver	16-plex + 6-plex	1 S4 kørsel + 1 S2 kørsel	S4-sæt 1 eller 2, S2-sæt 1 til 4 (anvendes ikke til S4)

- Analysen fremtvinger ikke positiv prøvesporing. Selvom oversigten over QC-resultat for ploidi, der rapporteres af softwaren, eventuelt kan bruges til at identificere prøveombytninger, vil det ikke identificere mænd, der er byttet til mænd, eller kvinder, der er byttet til kvinder.
- Analysen giver kun validering op til VCF-filer for genomets output. Alle diagnostiske test, der bliver udviklet til brug sammen med TruSight Whole Genome, kræver fuld validering af alle ydeevneaspekter med valgte nedstrøms applikationer.
- Analysen rapporterer ikke variantbestemmelser for prøver, der ikke opfylder kvalitetskontrollen.
- Analysen definerer kun høje konfidensniveauer for SNV'er og indsættelser/sletninger 1-5 bp på grund af strenge kriterier, der anvendes til at definere en genomisk kontekst som høj konfidens for en given varianttype under [Bestemmelse af små varianters konfidensniveau på side 37](#).
- Analysen er designet til at evaluere CNV'er på tværs af hele det rapporterbare genom, uanset genomisk kontekst, og udelukker områder med egenskaber, der afspejler begrænsninger i referencegenomet, såsom centromer, telomerer og almindelige CNV'er, der adskilles i populationer.
- Analysens ydeevne blev ikke vurderet for kopinummervarianter under 10 kb.
- Analysen rapporterer ikke translokationer, inversioner eller afbalancerede omlejninger.
- Analysens ydeevne blev ikke vurderet for indsættelser eller sletninger af mitokondrie-DNA (mtDNA).

- Analysen rapporterer kun resultater for STR-loci, der er angivet i [Tabel 2](#). Når de sande STR-ekspansionslængder overstiger ca. 135 bp, vil den observerede længde ofte være en undervurdering af den sande længde på grund af tekniske begrænsninger ved korte aflæsninger, hvor denne effekt er endnu mere udtalt for FMR1. Når den sande STR-længde overstiger medianfragmentlængden (~330 bp), estimerer STR-længden plateauer.
- Analysen rapporterer ikke SMN1- eller SMN2-kopinummer.
- Analysen fremsætter ikke påstande om patogeniciteten af de påviste varianter.

Produktets komponenter

TruSight Whole Genome består af følgende:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (katalognr. 20093209) og
- TruSight Whole Genome Analysis Application (katalognr. 20106190, installeret af uddannet Illumina-personale)

Reagenser

Medfølgende reagenser

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, varenummer 20072256

Reagensnavn	Stk.	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads forbundet med transposomer i vandig bufferopløsning.	-25 °C til -15 °C
Extension and Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligase, DNA Polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning.	-25 °C til -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N natriumhydroxid (NaOH)-opløsning.	-25 °C til -15 °C

Reagensnavn	Stk.	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder magnesiumsalt og dimethylformamid.	-25 °C til -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, varenummer 20072257

Reagensnavn	Stk.	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Vandig bufferopløsning indeholdende rensmiddel og salt.	15 °C til 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Vandig bufferopløsning.	15 °C til 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Paramagnetiske fastfase-perler i vandig bufferopløsning.	15 °C til 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Rensmiddelopløsning i vand.	15 °C til 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl-opløsning.	15 °C til 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, varenummer 20072258

Reagensnavn	Stk.	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer	Opbevaringstemperatur
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Unikke dobbelt (UD) indeksadaptere arrangeret på plade.	-25 °C til -15 °C

Nødvendige forbrugsstoffer, der ikke medfølger

- Ethanol 100 % (200 proof) til molekylærbiologi
- Certificeret RNase/DNase-frit vand
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cyklusser) (katalognr. 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cyklusser) (katalognr. 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr. 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr. 20062293)

- NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr. 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalognr. 20062291)

Opbevaring og håndtering

- Stuetemperatur er defineret som 15 °C til 30 °C.
- Hvis emballagen eller indholdet i TruSight Whole Genome Dx Library Prep-komponenterne er beskadiget eller brudt, kontakt Illumina kundeservice.
- Reagenserne er stabile ved de anførte opbevaringsbetingelser indtil den udløbsdato, der fremgår af mærkningen på sættene. Se [Medfølgende reagenser på side 5](#) for opbevaringsforhold. Opbevar analysekomponenterne ved deres specificerede temperatur, og anvend ikke udløbne reagenser. Byt ikke om på komponenter fra forskellige sætpartier. Sætpartier er angivet på æskens etiketter.
- Ændringer i reagensernes udseende kan være tegn på nedbrydning af materialerne. Reagenserne må ikke anvendes, hvis de ændrer udseende (f.eks. tydelig farveændring eller uklare). Hvis der bemærkes bundfald for ST2: Opvarm ved 37 °C i 10 minutter, og bland derefter på vortexblander, indtil bundfaldet er opløst.
- Stabiliteten af TruSight Whole Genome Dx Library Prep er blevet evalueret, og ydeevnen er påvist for op til fire anvendelser af de frosne rør, når de nedfryses mellem brug.

Udstyr og materialer

Nødvendigt udstyr, som ikke medfølger

Bekræft udstyrets kalibreringsstatus, før analysen startes.

Udstyr	Leverandør
Vortexblander med kapacitet til 3000 o/m, flad bund eller kop	Almen laboratorieleverandør
Mikroprøveinkubator kalibreret til at sikre en temperaturnøjagtighed på ± 2 °C	SciGene, katalognr. 1057-30-O (eller tilsvarende)
Indsats til mikroprøveinkubator til 96-brønds MIDI-plader	Illumina, katalognr. BD-60-601
Mikrocentrifuge	Almen laboratorieleverandør
96-brønds mikropfadecentrifuge	Almen laboratorieleverandør

Udstyr	Leverandør
Pladeryster med følgende specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Kan omryste ved 1800 o/m. • Blandingsorbital konstant 2 mm • Blandingsnøjagtighed på ± 25 o/m 	VWR, katalognr. 1808-0506 (eller tilsvarende)
Kile eller rulle til forsegling	Almen laboratorieleverandør
Magnetisk stativ med følgende specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Designet til paramagnetisk perleudfældning/-separation • Magneter på siden af stativet, ikke i bunden • Til 96-brønds MIDI-plader 	Thermo Fisher Scientific, katalognr. AM10027 (eller tilsvarende)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, katalognr. 20068232
Præcisionspipetter (enkeltkanal): <ul style="list-style-type: none"> • 10 μl • 20 μl • 200 μl • 1000 μl 	Almen laboratorieleverandør
Præcisionspipetter (8 kanaler): <ul style="list-style-type: none"> • 20 μl • 200 μl 	
Sørg for at pipetter kalibreres regelmæssigt og har en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen	
Pipettehjælper	Almen laboratorieleverandør

Nødvendige materialer, medfølger ikke

Sørg for, at du har de materialer, du skal bruge, før du starter protokollen.

Protokollen er optimeret og valideret ved brug af de anførte artikler. Der gives ikke garanti for samme ydeevne ved brug af andre materialer.

Materialer	Leverandør
5 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør
10 ml serologiske pipetter	Almen laboratorieleverandør

Materialer	Leverandør
Selvklæbende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer: <ul style="list-style-type: none"> • Optisk klar polyester, der kan afpilles • Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -40 °C til 110 °C • DNase/RNase-fri 	Almen laboratorieleverandør
Mikrocentrifugerør, nukleasefri (1,5, 1,7 eller 2,0 ml, medmindre det er angivet som 0,5 ml)	Almen laboratorieleverandør
Nukleasefri reagensreservoirer 50 ml eller tilsvarende (PVC, skål til engangsbrug)	Almen laboratorieleverandør
15 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
50 ml koniske rør	Almen laboratorieleverandør
20 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
200 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
1000 µl aerosolbestandige pipettespidser	Almen laboratorieleverandør
96-brønds opbevaringsplader, 0,8 ml (MIDI-plader)	Thermo Fisher Scientific, delnr. AB-0859 (eller tilsvarende)
96-brønds PCR-plader, 0,2 ml (RNase-/DNase-fri polypropylen med lav binding)	Almen laboratorieleverandør
Isspand og is	Ikke relevant
Kvantificerede genomiske DNA-prøver	Ikke relevant

Prøveindsamling, transport og opbevaring



FORSIGTIG

Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.

- Følg sikkerhedsprocedurerne, herunder brug af personligt beskyttelsesudstyr, ved indsamling, transport, opbevaring og behandling af humane blodprøver.
- Fuldblod skal transporteres i overensstemmelse med nationale, regionale og lokale regler vedrørende transport af ætiologiske stoffer.
- Indsaml 2-5 ml perifert fuldblod i EDTA-rør, og opbevar ved 2 °C til 8 °C i op til fem uger før ekstraktion.
- Der blev ikke observeret nogen negativ indvirkning på analysens ydeevne med fuldblodsprøver med forhøjet bilirubin, hæmoglobin, triglycerider, biotin eller EDTA. Se Interfererende stoffer.

- TruSight Whole Genome er kompatibel med kommercielt tilgængelige ekstraktionssæt og protokoller, der er egnede til brug til Next Generation Sequencing (NGS). Se [Evaluering af DNA-ekstraktionsmetode på side 35](#).
- TruSight Whole Genome er kompatibel med DNA elueret i en Tris bufferopløsning indeholdende ≤ 10 mM EDTA, såsom 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Det anbefales at eluere og opbevare DNA i TE. Undgå opbevaring i vand for at opnå stabilitet.

Anbefalinger vedrørende DNA-input

- Inden TruSight Whole Genome-analysen påbegyndes, skal det genomiske DNA, der er ekstraheret fra fuldblod, kvantificeres ved hjælp af enhver fluorometrisk kvantificeringsmetode, der anvender nukleinsyrebindende farvestoffer. Det anbefales, at gDNA for prøver, der er beregnet til en bestemt biblioteksklargøringsbatch og sekventeringskørsel, kvantificeres sammen for at eliminere batch-til-batch-variabilitet, når det er muligt, eller at proceskontroller anvendes til at sikre ≤ 25 % batch-til-batch-variabilitet for DNA-kvantificering.
- Undgå pipettering af små prøvevolumener ($< 2 \mu\text{l}$) for at sikre nøjagtig DNA-kvantificering og -input.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep kræver tilstrækkeligt DNA til at mætte BLT-PF-perlerne for effektiv selvnormalisering af biblioteksresultater og optimal ydeevne. På grund af variationen i resultater fra forskellige kvantificeringsmetoder viser følgende tabel det anbefalede DNA-input for tre kvantificeringsmetoder for at sikre optimal analyseydeevne. Brug af andre kvantificeringsmetoder kan kræve optimering. Se [Følsomhed over for DNA-input på side 35](#).

Quant Method	Mål for DNA-input (ng)	Minimal DNA-stammekonzentration
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ μl

Anbefalinger af færdigheder

Operatørfærdigheder og vellykket analyseimplementering kan vurderes ved at udføre hele arbejdsgangen én gang i henhold til brugsanvisningen. Denne arbejdsgang kan udføres med enten en enkelt biblioteksklargøring af seks prøver og sekventeringskørsel ved hjælp af en S2-flowcelle eller en enkelt biblioteksklargøring af 16 prøver og sekventeringskørsel ved hjælp af en S4-flowcelle. Succes angives ved at passere kørsels- og

biblioteks-QC-målingerne, der er registreret i den konsoliderede rapport, som TruSight Whole Genome Analysis Application-softwaren udarbejder. Se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Illumina anbefaler inklusion af genomiske DNA-prøver ekstraheret fra perifert fuldblod, der opfylder kvalifikationskriterierne for DNA-stammekonzentration og -volumen for at demonstrere vellykket analyseintegration med opstrøms laboratorieprocesser såsom prøveindsamling og -opbevaring samt DNA-ekstraktions- og -kvantificeringsprocedurer. Kommercielt tilgængelige genomiske DNA-referenceprøver afledt fra en enkelt human donor, såsom NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium), kan også anvendes.

Hvis der opstår problemer, henvises der til afsnittet [Fejlfinding på side 69](#) for anbefalede handlinger, og Illumina teknisk support kontaktes.

Advarsler og forholdsregler

- **Visse bestanddele af denne analyse indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger.** Du kan se sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- Alle alvorlige hændelser, der er relateret til dette produkt, skal omgående indberettes til Illumina og til de kompetente myndigheder i brugerens og patientens opholdsland.
- Alle prøver skal håndteres, som om de er infektiøse.
- Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel ved håndtering af prøver og analysereagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og analysereagenser.
- Denne analyse indeholder polyethylenglykol. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader.
- Denne analyse indeholder natriumhydroxid. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader.
- Procedurene til klargøring af bibliotek kræver et RNase/DNase-frit miljø. Dekontaminer arbejdsområderne grundigt med et RNase/DNase-inhiberende rensmiddel.
- Brug nukleasefrie mikrocentrifugerør, plader, pipettespidser og reservoirer.
- Brug kalibreret udstyr gennem hele analysen. Sørg for at kalibrere udstyret til de hastigheder, temperaturer og volumener, der er angivet i denne protokol.
- Brug præcisionspipetter for at sikre nøjagtig levering af reagens og prøve. Kalibrer regelmæssigt i henhold til producentens specifikationer.

- Sørg for at bruge udstyr specificeret til analysen og indstille programmerne som anvist.
- Angivne temperaturer for mikroprøveinkubatoren indikerer den indstillede reaktionstemperatur, ikke nødvendigvis den temperatur, der er angivet for udstyret.
- Byt ikke om på sætkomponenter fra forskellige TruSight Whole Genome Dx Library Prep-partier. Partier er angivet på æskens etiketter.
- Korrekt laboratoriepraksis kræves for at forhindre, at nukleaser og PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering, prøver og biblioteker. Kontaminering med nuklease og PCR-produkter kan medføre unøjagtige og upålidelige resultater.
- Korrekt pladetype kræves for optimal analyseydelse og opbevaring. Sørg for at følge instruktionerne til overførsel af plade i [Brugsvejledning på side 15](#).
- Der kan forekomme krydskontaminering eller prøvetab, hvis pladeforseglingerne ikke omhyggeligt påsættes eller fjernes (se [Håndtering af biblioteksklargøringsplader på side 13](#)).
- Manglende overholdelse af de beskrevne fremgangsmåder kan medføre fejlagtige resultater eller betydeligt nedsat bibliotekskvalitet.
- Opbevar analysereagenser eller komponenter ved de anviste temperaturer.
- Reagenser må ikke opbevares i en frostfri opbevaringsenhed.
- Brug ikke reagenser, der har været opbevaret forkert.
- Brug ikke nogen komponenterne efter deres angivne udløbsdato.
- Klargør 0,2N NaOH (fortyndet HP3) på brugsdagen, og kasser det resterende volumen efter brug.
- Klargør frisk 80 % ethanol med RNase/DNase-frit vand på brugsdagen. Ethanol kan absorbere vand fra luften, hvilket kan påvirke resultaterne. Bortskaf 80 % ethanol efter brug i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger. Brug molekylærbiologisk ethanol.

Procedurenoter

Tip og teknikker

Forebyggelse af krydskontaminering

- Skift spidser mellem *hver prøve*, når du tilføjer eller overfører prøver.
- Skift spidser mellem *hver brønd*, når du tilføjer adaptere eller primere med en multikanalpipette.
- Udfør forsegling af og fjernelse af forsegling på pladerne på en bordplade for at forhindre krydskontaminering af prøver.
- For at undgå kontaminering er hver indeksbrønd til engangsbrug.
- Brug de angivne skålvolumener, og hæld ikke resterende volumen fra skåle tilbage i lagerrør, da dette kan forårsage kontaminering. Der er tilstrækkelig volumen til at understøtte arbejdsgangen.

- Saml ikke biblioteker fra forskellige klargøringer i samme pulje.

Pipetteringsnøjagtighed

Brug følgende retningslinjer ved brug af multikanalpipetter:

- Sørg for, at barrierespidserne sidder godt fast og er egnet til multikanalpipettens mærke og model.
- Fastgør spidserne med en rullende bevægelse for at sikre, at alle spidser sidder lige godt fast.
- Opsug med lige volumenniveauer af væske på tværs af alle spidser.
- Pipetter viskøse opløsninger (BLT-PF, CB, ELM, TWB2) langsomt.
- Efter dispensering skal det sikres, at væske dispenseres fra alle spidser.

Undgå skumdannelse

- Pipetter langsomt, og vend op og ned for at blande indholdet. Bland ikke ELM og TWB2 på vortexblander.

Håndtering af indeksplader

- Prik kun hul i folieforsegling på indekser, der skal anvendes.
- Håndter pladen ved kanterne, og undgå at berøre folieforseglingen med andet end rene pipettespidser.
- Genbrug ikke brønde med perforeret forsegling.
- Bortskaf ubrugt volumen (~30 µl) efter brug fra perforerede brønde på indekspladen, og anbring forseglingen over perforerede brønde for at undgå krydskontaminering.
- Anbring ikke forseglingen over ubrugte brønde, da dette forstyrrer perforeringen.

Håndtering af biblioteksklargøringsplader

- Forsegl altid pladen, før den opbevares, rystes, inkuberes eller centrifugeres.
- Pladen forsegles ved at påføre det selvklæbende overtræk med en kile eller rulle til forsegling.
- Sørg for, at kanterne og brøndene er fuldstændigt forseglede for at reducere risikoen for krydskontaminering og fordampning.
- Forsegl altid pladerne med en ny, selvklæbende pladeforsegler. Forseglinger må ikke genbruges.
- Placer pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.
- Hvis ikke andet er angivet, kan trin udføres med pladen på eller væk fra magneten.

Overførsel af plade

- Ved overførsel af volumener mellem plader skal den specificerede volumen fra hver brønd i kildepladen overføres til den tilsvarende brønd i destinationspladen.

Skåle

- Reagensskåle kan anvendes, hvor det er angivet. Overhold følgende retningslinjer:
 - Klargør skål med CB efter blanding med vortexblander. Det er ikke nødvendigt at returnere CB til røret og blande med vortexblander før det andet trin med perletilsætning.
 - Mærk skåle med TWB2 og RSB for at undgå forvirring.
 - Bortskaf reagenserne, når de er angivet eller ved afslutningen af arbejdsgangen.

- Brug anbefalet volumen. Anbefalede volumener omfatter 1 ml overskud til skålens dødvolumen.
- RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Læs omhyggeligt hver etiket før brug.

Centrifugering

- Centrifuger kun ved de angivne trin i proceduren for at konsolidere væske eller perler i bunden af brønden for at forhindre prøvetab.

Håndtering af perler

- Må ikke nedfryses Cleanup Beads (CB).
- Når perlerne vaskes:
 - Brug Magnetic Stand-96 til alle MIDI-plader.
 - Dispenser væske, så ingen perler klæber sig til siden af brønden.
 - Hold pladen på det magnetiske stativ.
- Tilsæt altid reagenser til midten eller bunden af brønden uden at forstyrre perlepelleten. Tilsæt ikke reagenser til toppen af brønden.
- Pipetter perlesuspensionerne langsomt.
- Bland perlerne på vortexblander, indtil de er godt spredt. Væskens farve skal fremstå homogen. Bland på vortexblander, når det er specificeret i protokollen, for at sikre, at perler resuspenderes på brugstidspunktet.
- Hvis perlerne ikke resuspenderes, ryst igen.
- Hvis perlerne suges utilsigtet op i pipettespidsen, skal du dispensere reaktioner tilbage til pladen på det magnetiske stativ og vente, indtil væsken er klar (2 minutter).
- Opbevares lodret for at sikre, at perlerne er nedsænket i bufferen, når de returneres til opbevaring efter brug.

Kontroller

TruSight Whole Genome bruger analytiske kontroller, der er indbygget i TruSight Whole Genome Analysis Application-softwaren til datakvalificering, og kræver ikke brug af eksterne batchkontroller. Se [Kvalitetskontroller på side 31](#) for yderligere oplysninger om metriske specifikationer.

Brugsvejledning

TruSight Whole Genome Dx Library Prep-arbejdsgang

Følgende diagram illustrerer arbejdsgangen for TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene.

Hvis du stopper, skal du returnere de resterende reagenser til de originale rør ved deres opbevaringstemperatur, som er angivet i [Medfølgende reagenser på side 5](#). Hvis du fortsætter, skal du gå videre til næste afsnit i protokollen med de klargjorte reagenser.



Batchplanlægning og kørselsoprettelse

Planlæg antallet af prøvebiblioteker for batchen samt indeksering og puljedannelse for sekventeringskørsler.

TruSight Whole Genome er blevet evalueret og ydeevnen påvist for fire sæt indekser for S2-flowcellen ([Figur 1, Tabel 4](#)) og to sæt indekser for S4-flowcellen ([Figur 2, Tabel 5](#)). Softwaren implementerer brugen af specificerede indekssæt. Mix og match ikke specificerede indekssæt.

Sekventeringspleksitet uden for disse anbefalinger understøttes ikke.

S2 Indeks- og S4 Indekssæt understøtter tilsammen biblioteksklargøringsbatchstørrelser på 6, 12, 16, 18, 22 og 24 prøver. Brug de kompatible indekssæt, der er angivet i [Tabel 3](#) for hver biblioteksklargøringsbatchstørrelse.

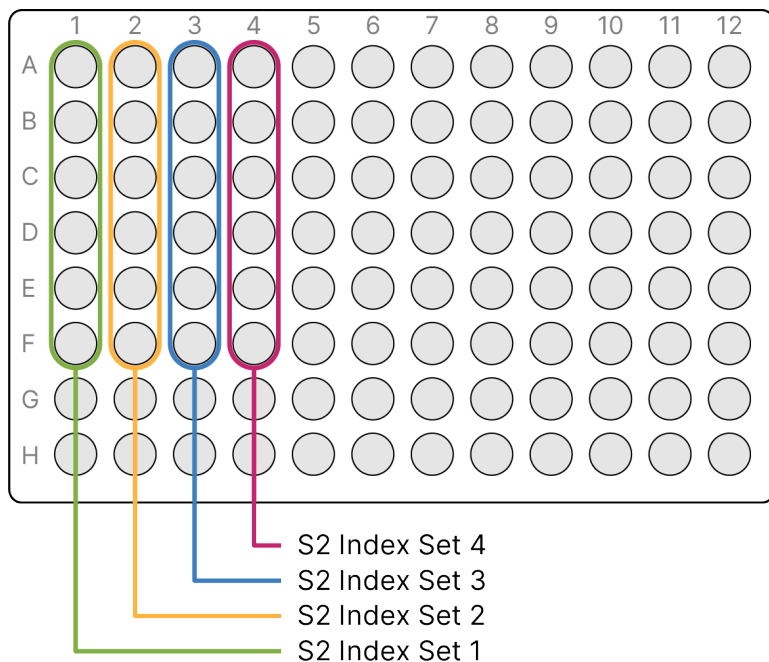
**FORSIGTIG**

Arranger prøverne i pladen ved hjælp af en retning, der matcher den planlagte indeksering, dvs. række A til H for et 16-plex eller række A til F for et 6-plex. Tilføj indekser ved hjælp af en multikanalpipette for at undgå at springe en brønd over eller tilføje to sæt indekser til en enkelt prøve, hvilket kan give henholdsvis ingen resultater eller falske resultater.

Tabel 3 Indstillinger for indekssæt til biblioteksklargøringsbatch

Batchstørrelse til biblioteksklargøring	Indekseringssæt	Flowcellekonfigurationer
6 prøver	S2 Indekssæt 1, 2, 3 eller 4 (vælg et sæt)	S2 x 1
12 prøver	S2 Indekssæt 1, 2, 3 eller 4 (vælg 2 sæt)	S2 x 2
18 prøver	S2 Indekssæt 1, 2, 3 eller 4 (vælg 3 sæt)	S2 x 3
24 prøver	S2 Indekssæt 1, 2, 3 og 4	S2 x 4
16 prøver	S4 Indekssæt 1 eller 2	S4 x 1
22 prøver	S4 Indekssæt 1 + S2 Indekssæt 3 eller 4 S4 Indekssæt 2 + S2 Indekssæt 1 eller 2	S4 x 1 og S2 x 1

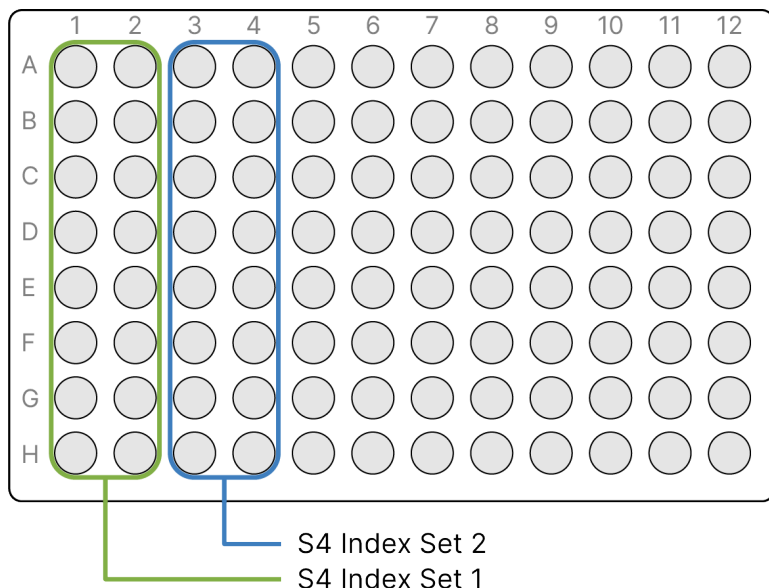
Figur 1 Indekspladelayout, der viser fire indekssæt til S2-flowcellesekventering



Tabel 4 S2 Indekssæt til S2-flowcelle

	S2 Indekssæt 1 (grøn)	S2 Indekssæt 2 (gul)	S2 Indekssæt 3 (blå)	S2 indekssæt 4 (magenta)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Figur 2 Indekspladelayout, der viser to indekssæt til S4-flowcellesekventering



Tabel 5 S4 Indekssæt til S4-flowcelle

	S4 Indekssæt 1 (grøn)		S4 Indekssæt 2 (blå)	
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
G	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
H	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Registrer unikt batchnavn og prøvedata, herunder prøve-ID, tilknyttet indekspladebrønd-ID (se [Bilag A på side 84](#) biblioteksplade, bibliotekspladebrønd-ID og biblioteksør-ID (hvis kendt). Disse oplysninger indtastes under kørselsoprettelse.

For instruktioner om hvordan man opretter en kørsel, se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931). Registrer det Run Name (Kørselsnavn), der skal bruges under isætning af forbrugsstoffer.

**FORSIGTIG**

Sørg for, at indekserne og de tilknyttede prøver, der bruges under biblioteksklargøring, svarer til dem, der blev optaget og brugt til oprettelse af kørslen. Uoverensstemmelser kan medføre rapportering af forkerte resultater eller ingen resultater.

Klargør til protokol

Klargør reagenser og udstyr

Hvis der planlægges sekventering samme dag, skal sekventeringsmaterialer optøs på forhånd. Se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105) for detaljerede instruktioner.

1. Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-pladeindsats til 47 °C.
2. Tag følgende reagenser ud af æsken, og optø på følgende måde.

Tabel 6 Opbevaring ved -25 °C til -15 °C

Reagens	Navn på æske	Instruktioner til optøning
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter. Opbevar derefter på is, indtil den skal bruges.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.
UD-indekser	TruSight Whole Genome Dx 32 unikke dobbeltindekser	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.

Tabel 7 Opbevaring ved 15 °C til 30 °C

Reagens	Navn på æske	Instruktioner til optøning
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Anvendes ved rumtemperatur.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Anvendes ved rumtemperatur.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Anvendes ved rumtemperatur.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Anvendes ved rumtemperatur.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Anvendes ved rumtemperatur.



FORSIGTIG

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

Klargør DNA-prøver

Klargør følgende forbrugsstoffer.

- Kvantificerede gDNA-prøver:
 - a. Lad henstå for at opnå rumtemperatur.
 - b. Centrifuger kortvarigt for at opsamle små dråber.
 - c. Pulser DNA på vortexblander for at blande indholdet, og centrifuger kortvarigt.
- RSB – Bland på vortexblander, eller vend op og ned for at blande indholdet. Opbevar ved rumtemperatur.
 - RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Aflæs omhyggeligt hver etiket før brug.

Fremgangsmåde

Afhængigt af DNA-inputtet, som varierer afhængigt af den anvendte DNA-quantificeringsmetode, beregnes de volumener, der kræves for at klarlægge fortyndede DNA-prøver. Formler er angivet nedenfor for de tre testede DNA-quantificeringsmetoder. Se [Anbefalinger vedrørende DNA-input på side 10](#) og [Bilag B på side 87](#) for yderligere oplysninger.

Beregningerne antager et minimum pipetteringsvolumen på 2,0 µl og inkluderer 10 % overskud. Afrunding skal udføres ved de sidste trin, efter at beregningerne er fuldført, med det nødvendige antal decimaler for at sikre nøjagtig pipettering.

Valgmulighed 1: 280 ng DNA-input til kvantitative metoder og Qubit bredområdekvantificeringsmetoder

Prøvens minimale DNA-stammekonzentration er 11,2 ng/µl. Prøver < 11,2 ng/µl har større sandsynlighed for at fejle biblioteks-QC efter sekventering. Afhængigt af koncentrationen af DNA-stammen skal du bruge en af nedenstående ligninger til at udføre beregninger.

1. For DNA-stammekonzentration fra 11,2 til 154,0 ng/µl beregnes volumen af DNA-stammen og RSB, der er nødvendigt, ved hjælp af en samlet volumen af fortyndet DNA på 27,5 µl (25 µl plus 10 % overskud) som konstant:
 - a. Beregn volumen af DNA-stammen:
 - b. Beregn volumen af RSB-stammen:
 - c. Bekræft beregninger: Bekræft den beregnede DNA-stammevolumen (µl) + den beregnede volumen af RSB (µl) = 27,5 µl, den samlede volumen af fortyndet DNA (konstant, 25 µl plus 10 % overskud).
2. Alternativt kan man for DNA-stammekonzentrationer > 154,0 ng/µl beregne det samlede volumen af fortyndet DNA og RSB, der er nødvendigt, ved hjælp af DNA-stammevolumen 2,0 µl og målrette fortyndet DNA-stammekonzentration 11,2 ng/µl som konstanter.
 - a. Beregn det samlede volumen af fortyndet DNA:
 - b. Beregn volumen af RSB:

- c. Bekræft beregninger: Bekræft den beregnede samlede volumen af fortyndet DNA (μl) - den beregnede volumen af RSB (μl) = 2,0 μl , DNA-stammevolumen (en konstant).

Fortsæt til trin 3 nedenfor.

Valgmulighed 2: 350 ng DNA-input til Accuclear metode til kvantificering af ultrahøj sensitivitet

Prøvens minimale DNA-stammekonzentration er 14,0 ng/ μl . Prøver < 14,0 ng/ μl er mere tilbøjelige til at fejle biblioteks-QC efter sekventering. Afhængigt af koncentrationen af DNA-stammen skal du bruge en af nedenstående ligninger til at udføre beregninger.

1. For DNA-stammekonzentration fra 14,0 til 192,5 ng/ μl beregnes volumen af DNA-stamme og RSB, der er nødvendig, ved hjælp af en samlet volumen fortyndet DNA på 27,5 μl (25 μl plus 10 % overskud) som konstant:
 - a. Beregn volumen af DNA-stammen:
 - b. Beregn volumen af RSB-stammen:
 - c. Bekræft beregninger: Bekræft den beregnede DNA-stammevolumen (μl) + den beregnede volumen af RSB (μl) = 27,5 μl , den samlede volumen af fortyndet DNA (konstant, 25 μl plus 10 % overskud).
2. Alternativt kan man for DNA-stammekonzentrationer > 192,5 ng/ μl beregne den samlede volumen af fortyndet DNA og RSB, der er nødvendigt, med DNA-stammevolumen 2,0 μl som en konstant.
 - a. Beregn det samlede volumen af fortyndet DNA:
 - b. Beregn volumen af RSB:
 - c. Bekræft beregninger: Bekræft den beregnede samlede volumen af fortyndet DNA (μl) - den beregnede volumen af RSB (μl) = 2,0 μl , DNA-stammevolumen (en konstant).
3. Mærk et nyt 0,5 ml mikrocentrifugerør for hver fortyndet prøve.
4. Tilsæt den volumen RSB, der er beregnet ovenfor, til det respektive rør for hver fortyndet prøve.
5. Tilsæt den volumen DNA-stamme, der er beregnet ovenfor, til det respektive rør for hver fortyndet prøve.
6. Pulser på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Biblioteksklargøring

Brug klaringsstrinnene i dette afsnit til at klarlægge reagenser på forhånd.

Medmindre der er angivet et sikkert stoptidspunkt, skal du fortsætte til næste trin med det samme.

Klargøring

Klargør følgende forbrugsstoffer:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Bland på vortexblander. Hvis der anvendes flere rør, bland på vortexblander, og kombiner derefter.

- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Bland på vortexblander.
 - b. Centrifuger kortvarigt.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Inspicer for bundfald. Hvis der bemærkes bundfald: Opvarm ved 37 °C i 10 minutter, og bland derefter på vortexblander, indtil bundfaldet er opløst.
 - b. Bland grundig på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- ELM (Extension and Ligation Mix):
 - a. Vend op og ned for at blande indholdet. Bland ikke på vortexblander.
 - b. Opbevar på is indtil brug.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - b. Opbevar ved rumtemperatur.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - b. Opbevar ved rumtemperatur.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Bland på vortexblander i 1 minut.
 - b. Vend op og ned 2-5 gange for at blande indholdet, og bland derefter grundigt på vortexblander for at resuspendere.
- Indeksadaptere (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - b. Opbevar ved rumtemperatur.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Mærk rørets hætte TWB2.
 - b. Vend op og ned for at blande indholdet grundigt.
- I et mikrocenrifugerør mærket 0,2N NaOH kombineres følgende volumener for at forberede 0,2N NaOH i henhold til den planlagte batchstørrelse. Bland på vortexblander.

BEMÆRK Hvis du planlægger at samle og denaturere biblioteker samme dag, skal du forberede yderligere 0,2N NaOH. Se [Klargøring på side 28](#).

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120

Reagens	6 prøver (μ l)	12 prøver (μ l)	16 prøver (μ l)	18 prøver (μ l)	22 prøver (μ l)	24 prøver (μ l)
RSB	270	540	720	810	990	1080

- I et 15 ml konisk rør kombineres følgende volumener for at klargøre 80 % EtOH i henhold til den planlagte batchstørrelse. Overskud til brug af skål er inkluderet. Bland på vortexblander.

Reagens	6 prøver (ml)	12 prøver (ml)	16 prøver (ml)	18 prøver (ml)	22 prøver (ml)	24 prøver (ml)
100 % ethanol, ren (200 proof)	4	8	8	12	12	12
Nukleasefrit vand	1	2	2	3	3	3



FORSIGTIG

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende regionale, nationale og lokale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

Tagmentering af genomisk DNA

På dette trin anvendes der Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) til at tagmentere DNA, hvilket er en proces, der fragmenterer og tagger DNA med adaptersekvenser.

Forbrugsstoffer

- 96-brønds MIDI-plade
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

Fremgangsmåde

1. Bekræft, at mikroprøveinkubatoren med MIDI-pladeindsatsen er forvarmet til 47 °C.
2. Mærk en ny 96-brønds MIDI-plade LP1 (Bibliotekplade 1).
3. Angiv og registrer prøvebrønd-ID'er til tagmentering af fortyndede DNA-prøver og reagenser.
4. Overfør 25 µl fortyndet prøve-DNA til hver brønd.
5. Tilføj 10 µl TB1 til hver brønd.
6. Bland BLT-PF kraftigt på vortexblander i 1 minut for at resuspendere. Centrifuger ikke. Gentag om nødvendigt.
7. Tilføj 15 µl BLT-PF til hver brønd.
8. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut.
9. Inkuber LP1 på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 47 °C i 8 minutter.

BEMÆRK Der forventes let kondensering på pladeforseglingen. Centrifuger ikke.

10. Fjern forseglingen, og tilsæt 10 µl ST2 til hver brønd.
11. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut, og fortsæt derefter til næste trin.

Oprensning efter tagmentering

Følgende trin fjerner ubundet DNA og udfører bufferudveksling for at forberede det næste trin.

Forbrugsstoffer

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Skål

Om reagenser

- Pipetter TWB2 langsomt for at minimere skumdannelse.
- RSB og TWB2 er pakket i lignende rør. Aflæs omhyggeligt hver etiket før brug.

Fremgangsmåde

1. Fjern forsegling, og anbring LP1 på det magnetiske stativ. Vent, til væsken er klar (2 minutter).
2. Klargør TWB2-skål med volumener i henhold til følgende tabel, og mærk skålen tydeligt TWB2. Volumener inkluderer 1 ml overskud til skålens dødvolumen. Behold skål til senere trin.

Reagens	6 prøver (µl)	12 prøver (µl)	16 prøver (µl)	18 prøver (µl)	22 prøver (µl)	24 prøver (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10.900	11.800

3. Bibehold LP1 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 60 µl til at fjerne og kassere supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
4. Brug en multikanalpipette til at tilsætte 150 µl TWB2 til hver brønd.
5. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut.
6. Fjern forsegling, og anbring LP1 på det magnetiske stativ. Vent, til væsken er klar (2 minutter).
7. Sæt BLT-PF tilbage i frossen opbevaring under inkubation, og fortsæt derefter til næste trin.

Ligering af indekser

I dette afsnit ligger brugere de unikke dobbeltindeksadaptere til hver prøve i henhold til indeksering planlagt under [Batchplanlægning og kørselsoprettelse på side 15](#).

Forbrugsstoffer

- ELM (Extension and Ligation Mix)
- Indeksadaptere (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) skål
- 0,2N NaOH (fortyndet HP3)

Om reagenser

- Indekspladebrøndene kan ikke genbruges.
- Opsug og dispenser ELM langsomt på grund af opløsningens viskositet.
- RSB og TWB2 er pakket i rør, der ligner hinanden. Aflæs omhyggeligt hver etiket før brug.

Fremgangsmåde

1. Behold LP1 på det magnetiske stativ, og udfør følgende trin:
 - a. Brug en multikanalpipette indstillet til 150 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver brønd.
 - b. Uden at forstyrre perlepelleten, brug en pipette indstillet til 20 µl til at fjerne og kassere resterende TWB2 fra hver prøvebrønd.
 - c. Tilføj 45 µl ELM til hver brønd.
 - d. Prik hul i folieforseglingen på indeksadapterpladen for hver af de planlagte indeksbrønde ved hjælp af en P200 multikanalpipette og nye pipettespidser. Brug en ny pipettespids til hver brønd for at undgå kontaminering.
 - e. Tilsæt 5 µl indeksadaptere til de tilsvarende prøvebrønde i LP1 i henhold til de indekser, der blev valgt under batchplanlægning ved hjælp af en P-10 eller P-20 multikanalpipette.
2. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut.
3. Inkuber LP1 på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 47 °C i 8 minutter.

BEMÆRK Der forventes let kondensering på pladeforseglingen. Centrifuger ikke.

4. Sæt ELM tilbage i frossen opbevaring under inkubation.
5. Fjern forsegling, og anbring LP1 på det magnetiske stativ. Vent, til væsken er klar (2 minutter).
6. Bibehold LP1 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 50 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
7. Vask perlerne som følger.
 - a. Tilsæt 150 µl TWB2 til perlerne i hver brønd ved hjælp af en multikanalpipette.
 - b. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut.
 - c. Fjern forsegling, og anbring LP1 på det magnetiske stativ. Vent, til væsken er klar (2 minutter).
 - d. Bibehold LP1 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 150 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
8. Vask perlerne en **ekstra** gang.
9. Bibehold LP1 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 20 µl til at fjerne og kassere resterende TWB2 fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
10. Tilsæt 45 µl tidligere klargjort 0,2N NaOH til hver brønd.
11. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut, og fortsæt derefter til næste afsnit.

Size-Selection and Clean Up Libraries

Dette trin bruger en dobbeltsidet størrelsesvalg af biblioteker. I det første trin tilføjes Cleanup Beads til de eluerede biblioteker og BLT-PF perler. Derefter overføres supernatanten indeholdende det eluerede enkeltstrengede bibliotek til en ny plade, mens fragmenter, der er for store, bliver tilbage. I det andet trin tilføjes Cleanup Beads til de overførte biblioteker, og for små fragmenter fjernes. Derefter elueres bibliotekerne og overføres til den endelige biblioteksplade (FLP).

Forbrugsstoffer

- MIDI-plade med 96 brønde
- Skåle (3)
- PCR-plade
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nyklargjort 80 % ethanol (80% EtOH)

Klargøring

1. Bland CB på vortexblander, og vend derefter op og ned, indtil det er helt resuspenderet.
2. Klargør CB skål med volumener i henhold til følgende tabel, og marker skålen CB. Volumener er tilstrækkelige til begge tilsætningstrin og inkluderer 1 ml overskud i skålen til skålens dødvolumen. Det er ikke nødvendigt at blande mellem CB tilsætningstrin. Perlerne forbliver spredt under hele proceduren.

Reagens	6 prøver (μ l)	12 prøver (μ l)	16 prøver (μ l)	18 prøver (μ l)	22 prøver (μ l)	24 prøver (μ l)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

Fremgangsmåde

1. Fjern forseglingen, og tilsæt 40 μ l CB til brøndene i LP1 MIDI-pladen, der indeholder BLT-PF og 0,2N NaOH.
2. Forsegl og omryst LP1 ved 1800 o/min. i 1 minut.
3. Inkuber LP1 udenfor det magnetiske stativ ved stuetemperatur i 2 minutter.
4. Fjern forsegling, og anbring LP1 på det magnetiske stativ, og vent, indtil væsken er klar (5 minutter).
5. Mens pladen inkuberes, mærkes en ny MIDI-plade LP2 med 96 brønde.
6. *Overfør* 80 μ l supernatant fra LP1 på det magnetiske stativ til de tilsvarende brønde i LP2 ved hjælp af en multikanalpipette.
7. Tilføj 40 μ l CB til hver brønd på LP2 MIDI-pladen.
8. Forsegl og omryst LP2 ved 1800 o/min. i 1 minut.
9. Kasser LP1 MIDI-pladen.
10. Inkuber LP2 udenfor det magnetiske stativ ved stuetemperatur i 2 minutter.
11. Fjern forsegling, og anbring LP2 på det magnetiske stativ, og vent, indtil væsken er klar (5 minutter).
12. Bibehold LP2 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 120 μ l til at fjerne og kassere supernatant fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
13. Hæld tidligere klargjort 80 % EtOH i en mærket skål, og vask perlerne med LP2 på magneten på følgende måde.
 - a. Tilsæt 180 μ l 80 % EtOH ved hjælp af en multikanalpipette.
 - b. Vent 30 sekunder.
 - c. Brug en multikanalpipette, der er indstillet til 180 μ l, til at fjerne og kassere supernatant fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.
14. Vask perlerne en **ekstra** gang.
15. Bibehold LP2 på det magnetiske stativ, og brug en multikanalpipette indstillet til 20 μ l til at fjerne og kassere resterende EtOH fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
16. Behold LP1 på det magnetiske stativ, og lad den lufttørre i 4 minutter.
17. Kasser ubrugt 80 % EtOH og skål.
18. Klargør RSB-skål med volumener i henhold til følgende tabel, og mærk skålen RSB. Volumenerne omfatter 1 ml overskud til skålens dødvolumen.

Reagens	6 prøver (μ l)	12 prøver (μ l)	16 prøver (μ l)	18 prøver (μ l)	22 prøver (μ l)	24 prøver (μ l)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. Tilsæt 65 µl RSB til perlerne i hver brønd.
20. Forsegl og omryst LP2 ved 1800 o/min. i 1 minut.
21. Inkuber LP2 ved stuetemperatur i 2 minutter.
22. Fjern forsegling, og anbring LP2 på det magnetiske stativ, og vent, indtil væsken er klar (2 minutter).
23. Mærk en ny PCR-plade FLP (endelig biblioteksplade) og med det batchnavn, der blev brugt ved oprettelsen af kørslen.
24. *Overfør* 60 µl supernatant fra LP2 på det magnetiske stativ til de tilsvarende brønde i FLP ved hjælp af en multikanalpipette.

**FORSIGTIG**

Supernatant indeholder det endelige bibliotek og vil blive brugt under trinnet for puljedannelse og denaturering. Må ikke kasseres.

25. Kasser alle skåle sammen med ubrugte reagenser i skåle.
26. Kasser LP2 MIDI-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis der stoppes, skal den endelige biblioteksplade (FLP) forsegles med mikroforsegling B og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 14 dage.

Puljedannelse og denaturering af biblioteker

I dette afsnit opretter brugere puljer, der er planlagt i [Batchplanlægning og kørselsoprettelse på side 15](#), og fortynder og denaturerer.

Forbrugsstoffer

- HP3 (2N NaOH), eller 0,2N NaOH hvis klargjort på samme dag – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- NB (Neutralization Buffer) – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- RSB (Resuspension Buffer) – Bland på vortexblander, eller vend op og ned for at blande indholdet.
- Mikrocentrifugerør (et til klargøring af reagens og et til hver planlagt bibliotekspulje)
- NovaSeq 6000Dx Biblioteks rør (varenummer 20062290 eller varenummer 20062291) (et rør til hver planlagt bibliotekspulje)

Klargøring

1. Kombiner følgende voluminer i et mikrocentrifugerør for at klargøre 0,2N NaOH. Mærk røret 0,2N NaOH. Hvis der blev klargjort yderligere 0,2N NaOH under biblioteksklargøring, og protokollen udføres samme dag, springes dette trin over.
For at forhindre små pipetteringsfejl klargøres der ekstra volumen.

Reagens	Volumen for hver S2-flowcelle (µl)	Volumen for hver S4-flowcelle (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Fremgangsmåde

1. Hvis FLP-pladen blev opbevaret i frossen tilstand, skal den klargøres som følger. Ellers gå videre til trin 2.
FLP-plade:
 - a. Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.
 - b. Centrifuger ved 1000 × g i 1 minut.
 - c. Fjern forseglingen fra FLP.
 - d. Pipetter blandingen 5-10 gange ved hjælp af en multikanalpipette indstillet til 30 µl.
 - e. Forsegl og centrifuger ved 1000 × g i 1 minut.
2. Vælg en af følgende indstillinger for at samle, denaturere og fortynde bibliotekerne for hvert sæt med 6 eller 16 prøver, der er planlagt til sekventering.

Valgmulighed 1 Sekventer 6 biblioteker på S2-flowcelle.

- a. For hver bibliotekspulje mærkes et nyt mikrocentrifugerør med puljenavnet, f.eks. samlede biblioteker (PL) 1, 2, 3 osv.
- b. Fjern forseglingen, og overfør 25 µl af hvert stregkodet DNA-bibliotek fra et givet S2-indekssæt fra FLP-pladen til PL-røret for hver tilsvarende planlagt kørsel i henhold til de sekventeringspuljer, der er planlagt under [Batchplanlægning og kørselsoprettelse på side 15](#). Kombiner f.eks. biblioteker, der er klargjort ved hjælp af S2 Indekssæt 1, i PL-røret.
- c. Påfør selvklæbende pladeforsegler til FLP-pladen, og sæt den tilbage i opbevaring.
- d. Tilsæt 37 µl 0,2N NaOH til hvert PL-rør.
- e. Bland hvert PL-rør på vortexblander. Centrifuger kortvarigt.
- f. Inkuber hvert PL-rør ved stuetemperatur i 8 minutter.
- g. Tilsæt 38 µl NB til hvert PL-rør.
- h. Bland hvert PL-rør på vortexblander. Centrifuger kortvarigt.
- i. Overfør 225 µl denatureret, fortyndet bibliotek til et rent NovaSeq 6000Dx biblioteksrør.

**FORSIGTIG**

Hvis det tidligere er angivet, vil NovaSeq 6000Dx biblioteksør-ID'et blive brugt til at identificere og tilknytte den planlagte kørsel. Sørg for, at det biblioteksør-ID, som puljen overføres til, er det samme biblioteksør-ID, som er angivet i oprettelse af kørsel, ellers kan der forekomme en forkert tilknytning af prøveresultaterne. Hvis biblioteksør-ID er angivet i den planlagte kørsel, skal det bekræftes, at det korrekte rør anvendes. Hvis det ikke tidligere er angivet, skal det anvendte biblioteksør-ID registreres og den planlagte kørsel revideres, ellers skal de(n) tilknyttede planlagte kørsel(/kørsler) vælges manuelt, når instrumentet isættes ved hjælp af kørselsnavnet.

Valgmulighed 2 Sekventer 16 biblioteker på S4-flowcelle.

- a. Mærk et nyt mikrocentrifugerør med puljenavnet, f.eks. samlede biblioteker (PL) 1, 2, 3 osv.
- b. Fjern forseglingen, og overfør 18 µl af hvert DNA-bibliotek fra FLP-pladen til PL-røret i henhold til den sekventeringspulje, der er planlagt under [Batchplanlægning og kørselsoprettelse på side 15](#). Kombiner f.eks. biblioteker ved hjælp af S4 Indeksset 1 i PL-røret.
- c. Påfør selvklæbende pladeforsegler til FLP-pladen, og sæt den tilbage i opbevaring.
- d. Tilsæt 22 µl RSB til PL-røret.
- e. Tilsæt 77 µl 0,2N NaOH til PL-røret.
- f. Bland PL-røret på vortexblander. Centrifuger kortvarigt.
- g. Inkuber PL-rør ved stuetemperatur i 8 minutter.
- h. Tilsæt 78 µl NB-buffer til PL-rørret.
- i. Bland PL-røret på vortexblander. Centrifuger kortvarigt.
- j. Overfør 465 µl denatureret, fortyndet bibliotek til et rent NovaSeq 6000Dx-biblioteksør.

**FORSIGTIG**

Hvis det tidligere er angivet, vil NovaSeq 6000Dx-biblioteksør-ID'et blive brugt til at identificere og tilknytte den planlagte kørsel. Sørg for, at det biblioteksør-ID, som puljen overføres til, er det samme biblioteksør-ID, som er angivet i oprettelse af kørsel, ellers kan der forekomme en forkert tilknytning af prøveresultaterne. Hvis biblioteksør-ID er angivet i den planlagte kørsel, skal det bekræftes, at det korrekte rør anvendes. Hvis det ikke tidligere er angivet, skal det anvendte biblioteksør-ID registreres og den planlagte kørsel revideres, ellers skal de(n) tilknyttede planlagte kørsel(/kørsler) vælges manuelt, når instrumentet isættes ved hjælp af kørselsnavnet.

3. Fortsæt direkte til sekventering, hvis det planlægges at starte kørslen samme dag.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis der stoppes, skal der sættes hætte på NovaSeq 6000Dx-biblioteksørret, og det opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargør til sekventering

1. Følg forberedelsesinstruktionerne i Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105) for forbrugsstoffer i sættet, der skal bruges til sekventering.
2. Hvis NovaSeq 6000Dx-biblioteksrøret med det samlede bibliotek blev opbevaret frosset, skal det klargøres på følgende måde. Gå til [3](#), hvis der fortsættes direkte fra forrige afsnit.
 - a. Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.
 - b. Fjern hættten, og pipetter forsigtigt fem gange med en P1000-pipette indstillet til 300 µl for S4-flowcellebibliotekspuljen eller en P200-pipette indstillet til 145 µl for S2-flowcellebibliotekspuljen.
 - c. Sæt låg på NovaSeq 6000Dx-biblioteksrøret, og ryst eventuelle dråber til bunden med hånden. Må ikke blandes på vortexblander eller centrifugeres.
3. Isætning af forbrugsstoffer. Se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105) for yderligere oplysninger.

Tolkning af resultater

TruSight Whole Genome er designet til at sekventere det menneskelige helgenom. Varianter rapporteres for prøver, der passerer analytiske kvalitetskontrol (QC) til brug med nedstrøms kimcelleapplikationer til tertiær analyse.

- Et sekventerings-, FASTQ- eller prøve kvalitetsresultat betragtes kun som gyldigt, hvis kvalitetsmålingen opfylder eller overstiger den definerede specifikation. Hvis kvalitetsmålingen er under den definerede specifikation, rapporteres ydeevnen som IKKE BESTÅET, og prøven skal gentages. Se [Kvalitetskontroller på side 31](#) for oplysninger om de kvalitetsmetriske specifikationer, der bruges til at bestemme prøvens gyldighed.
- Prøver, der består alle kvalitetsgrænseværdier, forventes at levere den variantbestemmelsesydelse, der er beskrevet i nøjagtighedsundersøgelsen (se [Nøjagtighed på side 41](#)).
- Små varianter annoteres med høj, intermediær eller lav konfidens baseret på hver varianttypes forventede ydeevne (se [Bestemmelse af små varianters konfidensniveau på side 37](#)).
- Tolkning af alle variantoplysninger skal valideres af laboratoriet ved hjælp af de medfølgende analyseoutputfiler. Se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931) for en beskrivelse af de oplysninger, der findes i outputfilerne.

Kvalitetskontroller

Sekventeringskørsel og prøvegyldighed bestemmes automatisk ved hjælp af analytiske kontroller og rapporteres af TruSight Whole Genome Analysis Application (se [Tabel 8](#) for yderligere oplysninger om specifikationerne for kvalitetskontrolmålinger). TruSight Whole Genome kræver ikke brug af eksterne positive kontroller.

- QC-resultaterne rapporteres i en konsolideret rapport for alle prøver i en kørsel og i individuelle prøve-QC-rapporter. Rapporterne sendes af softwaren til analysemappen. Se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931) for placeringen af analysemappen og kørselsmappen.
- Fejl i sekventeringskørselens kvalitetskontrolspecifikation ugyldiggør sekventeringskørslen og stopper yderligere analyse.
- Fejl i enhver prøve-FASTQ- eller biblioteksspecifikation ugyldiggør prøvebiblioteket og forhindrer output af de tilknyttede CRAM- eller VCF-filer.
- Yderligere kvalitetskontrollmålinger kan være gældende i overensstemmelse med lokale, statslige og/eller føderale forordninger eller akkrediteringskrav.

Se [Fejlfinding på side 69](#) for flere oplysninger om gentagelse af sekvenskørsler eller klargøring af biblioteker.

Tabel 8 TruSight Whole Genome – Beskrivelser af målingsspecifikationer for kvalitetskontrol

	Måling	Specifikation	Beskrivelse
QC af sekventeringskørsel	Samlet % \geq Q30	\geq 85	Måling af basekvalitet på kørselsniveau. Minimumsspecifikation er indstillet, fordi for lave %Q30-kørsler ikke vil bestå Q30-baser i prøvebiblioteks-QC.
FASTQ QC	Resultat pr. prøve (bps)	\geq 90.000.000.000	Minimum er indstillet til at svare til ~26x gennemsnitlig autosomal dækning til triageprøver, der ikke vil bestå biblioteks-QC for at reducere analysetiden.

	Måling	Specifikation	Beskrivelse
QC af prøvebiblioteker	Gennemsnitlig autosomal dækning	≥ 35	Gennemsnitlig dækning på tværs af autosomerne. Minimumsspecifikation er indstillet til at sikre analytisk ydeevne.
	Procentdel af autosomer med mere end 20X dækning	$\geq 93,94$	Måling af dækningsensartethed, som påviser problemer, der ikke nødvendigvis er relateret til GC-bias. Minimumsspecifikation er indstillet til at sikre analytisk ydeevne.
	Normaliseret dækning ved 60 % til 79 % GC-beholdere	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Måling af dækningsensartethed, der påviser GC-bias, specifikt et tab af dækning i områder af genomet med højere %GC- og lavere %AT-basesammensætning. Minimums- og maksimumsspecifikation er indstillet til at sikre analytisk ydeevne.
	Normaliseret dækning ved 20 % til 39 % GC-beholdere	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Måling af dækningsensartethed, der påviser GC-bias, specifikt et tab af dækning i områder af genomet med lavere %GC- og højere %AT-basesammensætning. Minimums- og maksimumsspecifikationer er indstillet til at sikre analytisk ydeevne.
	Gennemsnitlig mitokondriedækning	≥ 500	Dækning af mitokondriekromosomet. Minimumsspecifikationen er indstillet til at sikre mitokondrie-SNV-påvisningsgrænsen.
	Procentdel Q30-baser	≥ 85	Måling af basekvalitet. Minimumsspecifikation er indstillet til at sikre analytisk ydeevne.
	Estimeret prøvekontaminering	$\leq 0,005$	Påviser kontaminerende aflæsninger fra andre prøver. Maksimumsspecifikation er indstillet til at sikre mitokondrie-SNV-påvisningsgrænse (varianttypen med højeste sensitivitet over for kontaminering).

Karakteristika for ydeevne

Følgende valideringsundersøgelser blev udført ved hjælp af TruSight Whole Genome-arbejdsgangen, der er beskrevet i [Brugsvejledning på side 15](#), og blev designet til at sikre analysens robusthed over for almindelige variationskilder og til at give anbefalinger til ensartet ydeevne. Disse undersøgelser anvendte de analytiske QC-målingsspecifikationer, der er beskrevet i [Tabel 8](#) som benchmark for vellykket analyseydeevne, og som en forudsætning for etablering af ydeevnen for analysevariantbestemmelse.

Krydskontaminering

Krydskontamineringsstudiet evaluerede ukorrekt indeksaflysning pga. brønd-til-brønd kontaminering under klargøring af prøvebibliotek samt kørsel-til-kørsel kontaminering mellem konsekutive sekventeringskørsler. Der blev brugt 24 blodprøver til at evaluere krydskontaminering. I alt 24 biblioteker blev hver klargjort af to operatører ved hjælp af S2-konfigurationsindekssæt 1-4, og samlede biblioteker blev sekventeret i rækkefølge efter indekssæt på én NovaSeq 6000Dx Instrument. 16 biblioteker blev hver klargjort af to operatører ved hjælp af S4-konfigurationsindekssæt 1 og 2 i to replikater, og samlede biblioteker med skiftende indekssæt blev sekventeret på samme NovaSeq 6000Dx.

For at evaluere krydskontaminering blev korrekte indeksslæsninger sammenlignet med indeksslæsninger fra tilstødende brønde for brønd-til-brønd kontaminering og tidligere sekventeringskørsel for kørsel-til-kørsel kontaminering. Mængden af kontaminering fra kørsel til kørsel var $\leq 0,003178$ % for S2 og $\leq 0,002487$ % for S4-kørsler. For at evaluere prøve-til-prøve kontaminering blev prøvebibliotekets QC-måling for estimeret prøvekontaminering anvendt. Mængden af prøve-til-prøve kontaminering var 0,001, den laveste værdi rapporteret af analysesoftware. Disse resultater indikerer, at der er lav risiko for kontaminering i biblioteksklargøringen og sekventeringsarbejdsgangene.

I brug og midlertidig stabilitet

Biblioteksklargøringsreagenser blev vurderet for stabilitet under brug af sættet, herunder flere fryse-optøningshændelser og stabilitet af åbne rør.

Ved cyklustest af fryse-optøning blev de frosne komponenter udsat for fem fryse-optøningshændelser for at understøtte én hændelse til udpakning og fire hændelser til brug i sættet. For stabilitet under brug blev den påkrævede volumen fjernet til at klargøre seks prøvebiblioteker ved hver af de tre fryse-optøningscykluser for at simulere volumenudtømning under brug, og komponenterne blev opbevaret i yderligere 31 dage før testning. Ved testning med gDNA ekstraheret fra seks bloddonorer bestod alle data analysens analytiske kontrolmålinger. Disse resultater indikerer, at frosne biblioteksklargøringsreagenser kan anvendes med op til fire fryse-optøningscykluser og 30 dages stabilitet under brug.

Midlertidig stabilitet blev vurderet for de enkelte biblioteker og de samlede og denaturerede biblioteker. Alle data bestod analysens analytiske kontrolmålinger, hvilket indikerer op til 14 dages stabilitet for de enkelte biblioteker og op til 30 dages stabilitet for de samlede og denaturerede biblioteker, når de blev opbevaret frosne (-25 °C til -15 °C) som beskrevet i de sikre stoppunkter.

Indsamling og opbevaring af blodprøver

Kompatibilitet med blodprøverør og prøveopbevaring blev undersøgt ved hjælp af fire donorer og blod, der blev indsamlet i EDTA-indsamlingsrør fra tre forskellige leverandører. Genomisk DNA (gDNA) blev ekstraheret fra hver ved ankomsten til nul-tidspunkt og derefter igen efter at blodet var blevet opbevaret i 16, 33 og 43 dage ved 2 °C til 8 °C. Det ekstraherede gDNA blev opbevaret frossent (-25 °C til -15 °C) i elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) og kvantificeret og anvendt til biblioteksklargøring og sekventering. Alle data bestod analysekontrolmålingerne, hvilket angiver analysekompatibilitet med tre forskellige EDTA-blodprøvetagningsrør og blod opbevaret i op til fem uger ved 2 °C til 8 °C.

Evaluering af DNA-ekstraktionsmetode

Tre kommercielt tilgængelige ekstraktionssæt blev evalueret for analyseydelse. To sæt brugte magnetiske perler, et med og et uden fast fase og cellulosebaseret binding, og et sæt brugte en silikamembranbaseret nukleinsyreoprensningssæt ved hjælp af spinsøjler ([Tabel 9](#)).

Evalueringen blev udført af to operatører med ét parti ekstraktionsreagenser pr. metode og fuldblod opsamlet i EDTA-rør fra fire formodet sunde donorer. Hver blodprøve blev ekstraheret fire separate gange i henhold til producentens anvisninger på ikke-konsekutive dage til i alt 16 observationer pr. sæt. Det ekstraherede gDNA blev brugt til at klargøre biblioteker til sekventering og analyse.

Alle observationer (16/16) for hver ekstraktionsmetode bestod analysens kontrolmålinger. Analysens ydeevne blev ikke påvirket af valg af prøve-gDNA-ekstraktionsmetode. Analytiske undersøgelser af nøjagtighed og reproducerbarhed anvendte gDNA ekstraheret med sæt 3 (silikafilterkolonneisolering med spinsøjler).

Tabel 9 Ekstraktionsmetoder testet for TruSight Whole Genome ydeevne

Sæt	Ekstraktionsmetode
1	Magnetisk perleekstraktion med reversibel immobilisering i solid fase (SPRI)
2	Magnetisk perleekstraktion med mobil fast fase og cellulosebaseret binding
3	Isolering af silisafilterkolonne med spinsøjler

Følsomhed over for DNA-input

Den anbefalede mængde gDNA-input til testning pr. prøve er 280 ng eller 350 ng afhængigt af DNA-kvantificeringsmetoderne angivet i [Anbefalinger vedrørende DNA-input på side 10](#).

For at bestemme ydeevnen på tværs af en række koncentrationer af gDNA-input blev mængden af DNA, der blev anvendt i analysen, testet ved niveauer på $\pm 28,6\%$ af det anbefalede input. Resultaterne viste, at -25% af det anbefalede gDNA-input er en nedre grænse for analysen. Analysen fungerer korrekt med gDNA-input op til $+28,6\%$ af det anbefalede input.

Karakteriseringen af tre forskellige kvantificeringsmetoder viste, at forskellige metoder har forskellige niveauer af variabilitet og kan give forskellige resultater. Hvis der anvendes en anden metode end dem, der er angivet i [Anbefalinger vedrørende DNA-input på side 10](#), skal mål-gDNA-inputtet muligvis optimeres. Det anbefales, at

gDNA for prøver, der er beregnet til en bestemt biblioteksklargøringsbatch og sekventeringskørsel, kvantificeres sammen for at eliminere batch-til-batch-variabilitet, når det er muligt, eller at proceskontroller anvendes til at sikre $\leq 25\%$ gDNA-kvantificeringsbatch-til-batch-variabilitet.

Interfererende stoffer

Denne undersøgelse evaluerede ydeevnen med både endogene og eksogene stoffer forbundet med humant blod og blodprøvetagningsrør. Bilirubin, hæmoglobin og triglycerider blev udvalgt til evaluering for at simulere henholdsvis ikteriske, hæmolyserede og lipæmiske prøver. Biotin og EDTA blev udvalgt til evaluering på grund af tilstedeværelse i blod- og blodprøvetagningsrør (BCT'er) og for potentiel indvirkning på analysekemien. Stoffer blev tilsat donorblodprøverne før ekstraktion enten direkte eller efter opløsning i opløsningsmiddel. Testkoncentration og oplysninger om spike-in for hvert stof findes i følgende tabel.

Tabel 10 Interfererende stoffer testet for TruSight Whole Genome ydeevne

Stof	Testkoncentration	Opløsningsmiddel anvendt i Spike Solution	% spike tilsat blod
Bilirubin (ukonjugeret)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4 %
Hæmoglobin	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	I/T – Opløst i blod	I/T – Opløst i blod
Triglycerider	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100 % ethanol	4 %
Biotin	0,00351 mg/ml ²	Vand	4 %
EDTA	5,4 mg/ml ³	Vand	(3 %)

¹ Koncentrationerne blev valgt til at være de højeste observerede koncentrationer i henhold til "Supplerende tabeller for interferenstestning i klinisk kemi, CLSI EP37-ED1:2018".

² Koncentrationen blev valgt til at være tre gange den "Højeste lægemiddelkoncentration under terapeutisk behandling" angivet i "Supplerende tabeller for interferenstestning i klinisk kemi, CLSI EP37-ED1:2018".

³ Koncentrationen blev valgt baseret på EDTA-koncentrationen, som varierer i blodprøverør på op til 1,8 mg/ml, og for at simulere en kort fyldningshændelse blev der taget en blodprøve på 33 % af den nominelle BCT-volumen, hvilket førte til en 3x højere EDTA-koncentration i blod svarende til 5,4 mg/ml.

Blod fra fire donorer blev brugt til testning. For hvert interfererende stof blev en afmålt mængde fuldblod fra hver donor spædet op med interferenten og derefter delt mellem fire gDNA-ekstraktionsreplikater. En kontrol blev udført på samme måde uden tilsætning af stoffer. De parrede test- og kontrolbetingelser blev behandlet for hver donor inden for samme ekstraktionshændelse, og det ekstraherede gDNA blev derefter behandlet inden for en enkelt biblioteksklargørings- og sekventeringshændelse. Der var ingen indvirkning på analysens ydeevne og ingen evidens for interferens som reaktion på nogen af de testede stoffer.

Ækvivalens for prøveindeksering

TruSight Whole Genome giver mulighed for at vælge mellem fire 6-plex indekssæt til S2-kørsler eller to 16-plex indekssæt til S4-sekventeringskørselskonfigurationer. Analysen viste sig at give tilsvarende ydeevne, når biblioteker sekventeres på enten NovaSeq 6000Dx S2- eller S4-sekventeringskørselskonfigurationer. Derudover viste både S2- og S4-kørselskonfigurationerne sig at opnå > 95 % af prøvebibliotekerne med en dækning på mindst 35,0x, når de blev testet med de ordinerede indekssæt. Forskellige indekssæt og puljeoprettelse, der bruges til sekventering på S2- og S4-flowcellerne, kan således bruges omskifteligt for at give skalerbarhed til at imødekomme udsving i prøvegennemstrømning og give fleksibilitet i laboratorieprocesser.

Analytisk ydeevne

Der blev udført indledende karakteriseringsundersøgelser for at bestemme konfidensniveaugrænseværdien for små varianter, blindværdigrænsen/påvisningsgrænsen for mitokondrie-SNV'er og størrelsesgrænseværdier for nøjagtig påvisning af STR-ekspansioner ved brug af TruSight Whole Genome-arbejdsgangen. Prøver, der repræsenterede variantklasserne vurderet med TruSight Whole Genome blev inkluderet i evalueringen af analytisk nøjagtighed og repetérbarhed, herunder intralaboratoriepræcision og ekstern reproducerbarhed. Analytisk ydeevne rapporteres for sekventeringskørsler og prøver, der bestod alle kvalitetskontroller, bortset fra de konstruerede blandingsprøver, der blev brugt til at vurdere mitokondrie-SNV'er ved eller nær påvisningsgrænsen, som ikke bestod kontamineringsmålingen. Resultaterne for hver af disse undersøgelser beskrives i afsnittene nedenfor.

Indledende karakteriseringsundersøgelser

Bestemmelse af små varianters konfidensniveau

Til denne undersøgelse blev en logistisk regressionsmodel trænet ved hjælp af meget reproducerbare og dårligt reproducerbare variantsteder fra 96 replikater af NA12878 for at definere grænseværdier for høje, medium og lave konfidensniveauer.

Høje konfidensbaser for en given varianttype er dem, hvor forventet reproducerbarhed inden for laboratoriet opfylder eller overstiger 99 % for en given scoregrænseværdi, og procentdelen af ikke-N-baser, der opfylder dette kriterium, overstiger 30 %. Hvis en lille varianttype ikke har en scoregrænseværdi, der opfylder disse kriterier, vil den pågældende varianttype ikke have et højt konfidensniveau. Intermediære konfidensbaser er dem, hvor forventet reproducerbarhed inden for laboratoriet opfylder eller overstiger 95 % for en given scoregrænseværdi og varianttype. Lave konfidensbaser er dem, hvor forventet reproducerbarhed inden for laboratoriet er under 95 % for en given scoregrænseværdi og varianttype. Variantbestemmelser for en bestemt varianttype med et højt eller intermediært konfidensniveau omfatter størstedelen af % ikke-N baserne (dvs. eksklusive mellemrum) (se tabel 6) og demonstrerer høj ydeevne, når de vurderes i forhold til små variantsandhedssæt og i omfattende vurderinger af præcision inden for laboratoriet af NA12878-replikater.

Varianttype	Konfidenssniveau	% ikke-N-baser
SNV	Høj	89,14 %
	Intermediær	3,30 %
	Lav	7,56 %
Korte sletninger (1-5 bp)	Høj	90,88 %
	Intermediær	2,45 %
	Lav	6,67 %
Intermediære sletninger (6-15 bp)	Intermediær	86,94 %
	Lav	13,06 %
Lange sletninger (\geq 16bp)	Intermediær	85,42 %
	Lav	14,58 %
Korte indsættelser (1-5bp)	Høj	88,94 %
	Intermediær	4,61 %
	Lav	6,45 %
Intermediære indsættelser (6-15bp)	Intermediær	89,37 %
	Lav	10,63 %
Lange indsættelser (\geq 16bp)	Intermediær	48,92 %
	Lav	50,63 %

Bestemmelse af blindværdigrænse/påvisningsgrænse for mitokondrie-SNV

Undersøgelser af blindværdigrænse (LoB) og påvisningsgrænse (LoD) blev udført for mitokondrie-SNV'er. For mitokondrie-SNV-undersøgelsen blev LoB vurderet ved hjælp af loci, der ikke vides at have nogen variant (dvs. referencebestemmelse). LoD defineres som mtDNA SNV-variantalléfrekvensen, for hvilken påvisningsraten for den pågældende variant er 95 %.

For at bestemme LoB og LoD for påvisning af heteroplasmatiske mtSNV'er blev grundigt karakteriserede gDNA-prøver fra to forskellige bloddonorer blandet i en titreringsundersøgelse til fem fortyndingsniveauer med 20 replikater pr. fortyndingsniveau. Fortyndingsniveauerne blev designet til at målrette mtSNV-variantprocenter (1,2-6 % VAF) til at efterligne forskellige niveauer af mitokondrie-heteroplasm. Blandede gDNA-prøver blev behandlet, og aflæsningerne blev down-samlet til at opnå 500x gennemsnitlig mitokondriedækning. I alt 42 konstruerede "heteroplasmiske" steder blev anvendt i nedstrøms evaluering. En regressionsanalyse blev anvendt til at estimere de påkrævede blandingsforhold til mål 1x LoD og 2x LoD for en delmængde af mtSNV'er.

Positioner, hvor gDNA fra begge blodprøver har referenceallelgenotyper, blev evalueret for mtSNV-bestemmelser, der passerede filteret med en ikke-referenceallel. Den falske positive rate blev beregnet som 0,8 % i overensstemmelse med en antagelse om nul-LoB i henhold til "Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012". Hver af de 42 positioner blev

analyseret uafhængigt ved hjælp af probitregression. LoD-værdien blev defineret som den forventede VAF-værdi svarende til 95 % (C95) påvisningsraten. Den samlede rapporterede LoD-værdi, defineret som den 95. percentil af LoD-værdierne fra sandhedsstederne, var 4,75 % VAF. Middelfordelingen af absolutte forskelle mellem observeret og forventet VAF for alle observationer blev beregnet til at være 0,83 % med en øvre 95 % konfidensgrænse på 0,86 % VAF.

Bestemmelse af STR-ekspansionsgrænseværdi

På grund af tekniske begrænsninger i strækningen af STR'er, der overskrider sekventeringslæsningslængden (~135 bp), vil den observerede STR-længde med TruSight Whole Genome ofte være en undervurdering af den sande længde. Når den sande STR-længde overstiger medianværdien for fragmentlængde (~330 bp), estimerer STR-længden plateauer. Af denne grund vurderer TruSight Whole Genome et målrettet sæt loci, for hvilke analysen nøjagtigt kan skelne STR'er med observerede længder inden for normal variation fra dem med længder, der er større end observeret i en formodet sund population ("udvidet") (se [Tabel 2](#) for en liste over loci vurderet af TruSight Whole Genome).

For at sikre en samlet negativ procentvis overensstemmelse (NPA) på 95 % på tværs af alle STR-steder vurderet med TruSight Whole Genome, blev pr.-loci-grænseværdier for bestemmelse af en udvidet STR på det pågældende sted fastsat til at opnå en gennemsnitlig NPA på 99,94 % pr. sted. For at tage højde for den iboende variabilitet i estimererne af STR-størrelse inden for en formodet sund population blev der fastsat grænseværdier baseret på fordelingen af uafhængigt observerede STR-længder i det foreløbigt sunde 1000 Genomes Project-datasæt (2.504 prøver fra forskellige populationer behandlet med DRAGEN 3.7.5 og ExpansionHunter 4.0.2).⁴

For at bekræfte de grænseværdier, der blev fastsat ved hjælp af 1000 Genomes Project-datasættet, blev ekstraheret gDNA fra 16 cellelinjereferenceprøver (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Program) med en række uafhængigt estimerede STR-størrelser behandlet med TruSight Whole Genome. 10 biblioteksreplikater for hver af de 16 prøver blev klargjort og testet af seks operatører for i alt 960 observationer, og STR-størrelser blev uafhængigt estimeret for hvert replikat. Det observerede prøveniveau for falsk positiv rate på tværs af alle målrettede loci var 0,35 %.

Detektionsgrænsen (LoD) blev estimeret for de 28 målrettede STR-loci med de testede cellelinjer baseret på allel størrelser observeret med TruSight Whole Genome og de forventede allel størrelser baseret på forudgående uafhængig karakterisering ([Tabel 11](#)). For udvalgte loci blev der bestemt en påvisningsgrænse for mere end én STR på det samme sted for i alt 35 STR'er. LoD er den estimerede størrelse, hvor den forventede STR-ekspansion påvises for 95 % af alleler baseret på en probitmodel med de bekræftede grænseværdier for at skelne mellem normale og udvidede STR-størrelser. Dataene på tværs af alle steder med kendte allel størrelser blev samlet for at få LoD-estimerer for hvert sted baseret på den stedspecifikke grænseværdi for en udvidet STR. Længden af FMR1-gentagelsen blev systematisk undervurderet sammenlignet med andre STR'er og krævede en brugerdefineret model for at estimere LoD korrekt.

Bekræftede stedspecifikke grænseværdier for udvidede STR'er, estimeret forventet og observeret LoD for målrettede steder og sygdomsgrænseværdien baseret på tilgængelig litteratur (kun til illustrative formål) for målrettede STR-steder tilvejebringes i [Tabel 11](#). For STR-ekspansioner, som er længere end den grænseværdi, der dikteres af aflæsningslængden, og for hvilken den forventede længde ikke kan observeres direkte, ansår

en observeret længde en gennemsnitlig længde, der ville blive observeret i løbet af flere sekventeringskørsler. For STR-ekspansioner, som er kortere end den grænseværdi, der dikteres af aflæsningslængden, er de forventede og observerede længder de samme.

Tabel 11 Oversigt over estimeret påvisningskapacitet for TruSight Whole Genome-målede STR-steder

Mål for locus ^a	Udvidet STR-grænseværdi (bp) baseret på 1000 Genomes Project-datasæt	Estimeret LoD (forventet længde, bp)	Estimeret LoD (observeret længde, bp)	Sygdomsgrænseværdi (ægte længde, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
ATXN1	114	115	115	114 ^{7,8}
ATXN10	200	298	233	3995 ^{7,8}
ATXN2	102	102	102	105 ^{7,8}
ATXN3	135	189	182	180 ^{7,8}
ATXN7	60	60	60	111 ^{7,8}
ATXN7_GCC	93	101	101	I/T
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	I/T
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	I/T
CNBP_CAGA	68	80	80	I/T
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	I/T
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}
FXN_A	200	298	233	I/T
GLS	111	115	115	270 ¹⁷

Mål for locus ^a	Udvidet STR-grænseværdi (bp) baseret på 1000 Genomes Project-datasæt	Estimeret LoD (forventet længde, bp)	Estimeret LoD (observeret længde, bp)	Sygdomsgrænseværdi (ægte længde, bp) ^b
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	I/T
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	33	33	33	I/T
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	I/T
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	I/T
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Loci med vekslende STR'er er annoteret med LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (f.eks. ATXN7_GCC).

^b Sygdomsgrænseværdier, der kun er angivet til illustrative formål baseret på publiceret litteratur; I/T (ikke tilgængelig) i denne kolonne angiver, at STR muligvis ikke er forbundet med en publiceret patogen ekspansion.

^c 100 % af replikater af NA23378 påviste en STR-ekspansion i C9ORF72, hvilket tyder på en tidligere ukarakteriseret ekspansion på det pågældende sted i den pågældende prøve. Denne cellelinjeprøve blev udelukket fra analysen.

^d Intermediære ekspansioner kan også være forbundet med en fænotype.

Denne undersøgelse viste lignende præcisions- og nøjagtighedsprofiler for STR-størrelsesestimerer på tværs af forskellige målrettede loci, hvor påvisningsgrænsen for STR-ekspansioner i høj grad drives af den valgte grænseværdi (baseret på størrelsesfordelingen i 1000 Genomes Project-populationen) snarere end af forskelle i påvisningsevne på tværs af steder. Alle estimerede LoD-værdier i den forventede længdeskala var større end de længder, der blev set hos formodet sunde populationer og lavere end mange publicerede sygdomsgrænseværdier, hvilket gør de tilknyttede grænseværdier for STR-udvidelsesbestemmelse nyttige til markering af gentagelsen ved et bestemt locus som potentielt udvidet. Grænseværdier, der rapporteres her, blev brugt til at vurdere nøjagtigheden af STR-ekspansionspåvisning.

Nøjagtighed

Analytisk nøjagtighed blev bestemt ved at sammenligne TruSight Whole Genome-variantbestemmelser med resultater opnået ved hjælp af alternative metoder. Referencemetoderne blev valgt på grundlag af en betydelig forskel sammenlignet med TruSight Whole Genome, som anvender Nextera™ Bead-Linked biblioteksklargøring, sekventeringskemi baseret på to farvestoffer på NovaSeq 6000Dx og DRAGEN 3.9.5 til variantbestemmelse. Der blev udført en repræsentativ tilgang til validering af TruSight Whole Genome med prøver, der repræsenterede varianter på tværs af alle variantklasserne, der var inkluderet i analysens output. I alt 459 unikke prøver, der bestod den analytiske QC, blev anvendt til at evaluere nøjagtigheden af TruSight Whole

Genome. Prøverne blev testet på tværs af tre partier biblioteksklargøringsreagenser og forbrugstoffer, fire partier S4-sekventeringssæt, otte operatører, fem NovaSeq 6000Dx Instruments og to interne steder. 31 uafhængige bibliotekspuljer blev klargjort og sekventeret.

Følgende tabel angiver definitioner af målinger beregnet i forskellige nøjagtighedsstudier.

Betegnelse	Definition
Lavere konfidensniveau (LCL)	Ensidet 95 % lavere konfidensgrænse ved brug af Wilson-metoden.
Negativ procentvis overensstemmelse (NPA) ¹	Procentdel af negative steder som defineret af referencemetoden, der er overensstemmende identificeret som negative med TruSight Whole Genome.
Positiv procentvis overensstemmelse (PPA) ²	Procentdel af varianter bestemt i referencemetoden, som bestemmes i overensstemmelse med TruSight Whole Genome.
Teknisk positiv prædiktiv værdi (TPPV) ³	Procentdel af varianter bestemt med TruSight Whole Genome, som bestemmes i overensstemmelse med referencemetoden.

¹ For påvisningsnøjagtighed af STR-ekspansion og påvisningsnøjagtighed af SMN1-allel, NPA = sand negativ/(sand negativ + falsk positiv).

² For påvisningsnøjagtighed af STR-ekspansion og påvisningsnøjagtighed af SMN1-allel, PPA = sand positiv/(sand positiv + falsk negativ).

³ For påvisningsnøjagtighed af STR-ekspansion og påvisningsnøjagtighed af SMN1-allel, TPPV = sand positiv/(sand positiv + falsk positiv).

Nøjagtighed af lille variant

Nøjagtigheden af bestemmelse af små varianter blev vurderet ved hjælp af genomisk DNA ekstraheret fra perifert fuldblod fra 195 formodede sunde donorer. TruSight Whole Genome variantbestemmelser blev sammenlignet med variantbestemmelser fra en klinisk valideret helgenomsekventeringstest udført på Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA Laboratory som referencemetode. Referencemetodens arbejdsgang for helgenomsekventering bruger en ligeringsbaseret TruSeq™ PCR-fri biblioteksklargøring, 4-farve sekventeringskemi på HiSeq™-sekventeringssystemet og DRAGEN 3.8.4 til variantbestemmelse. Indsættelser og sletninger > 31 bp i størrelse blev ikke karakteriseret i denne undersøgelse, fordi de ikke blev valideret i referencemetoden.

En oversigt over nøjagtighed for alle små variantbestemmelser vises i [Tabel 12](#) og [Tabel 13](#).

Tabel 12 TruSight Whole Genome Assay-nøjagtighed for små varianter stratificeret efter konfidensniveau og -størrelse (formodet sunde blodprøver)

Variantundertype	Konfidensniveau	Overensstemmende bestemmelser for referencemetode	Eksklusive bestemmelser for referencemetode	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV'er	Høj	261.728.580	1.573.877	261.603.149	208.639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Intermediær	6.677.589	421.718	6.519.811	151.128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Lav	6.864.840	3.251.709	6.649.756	2.151.388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)
Kort sletning (1-5 bp)	Høj	11.978.745	201.783	12.246.922	67.277	98,3% (98,3%)	99,5 % (99,5%)
	Intermediær	2.875.258	45.290	3.050.170	47.593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Lav	1.802.544	228.582	1.966.974	221.449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
Medium sletning (6-15 bp)	Intermediær	858.673	20.079	860.493	18.361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Lav	145.618	28.300	157,398	41.824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
Lang sletning (16-31 bp)	Intermediær	344.168	14.334	336.976	31.165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Lav	54.444	23.438	53.835	47.272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)

Variantundertype	Konfidenssniveau	Overensstemmende bestemmelser for referencemetode	Eksklusive bestemmelser for referencemetode	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Kort indsættelse (1-5 bp)	Høj	11.212.366	164.651	11.380.307	49.776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Intermediær	1.015.324	41.890	988.512	36.051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Lav	639.663	198.700	576.797	180.458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)
Medium indsættelse (6-15 bp)	Intermediær	790.968	18.163	798.572	17.111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Lav	76.105	24.188	88.389	35.819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)
Lang indsættelse (16-31 bp)	Intermediær	159.927	3.135	159.432	8.639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Lav	102.552	22.199	103.892	55.724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Tabel 13 Oversigt over TruSight Whole Genome NPA for bestemmelser af små varianter stratificeret efter konfidenssniveau

Konfidenssniveau	Overensstemmende negative bestemmelser	Referencemetode Eksklusive negative bestemmelser	NPA (LCL)
Høj	202.276.243.790	127.465.816	99,9 %; (99,9 %)
Intermediær	3.307.740.675	77.650.177	97,7 % (97,7 %)
Lav	3.653.569.580	439.038.662	89,3 % (89,3 %)

Der blev udført en supplerende nøjagtighedsundersøgelse for at evaluere påvisning af små varianter med kommercielt tilgængelige DNA-prøver fra referencecellelinjer (Coriell Institute for Medical Research) med velkarakteriserede bestemmelsessæt genereret af Genome in a Bottle (GIAB) Consortium. Til dette forsøg blev GIAB-bestemmelsessættene brugt som referencemetode. Sandhedssættet i disse prøver omfatter indsættelser og sletninger på mere end 31 bp, så større indsættelser og sletninger blev inkluderet i denne vurdering. Disse prøver inkluderede HG001-005 og NA24695 med resultaterne vist samlet i [Tabel 14](#).

Tabel 14 TruSight Whole Genome Assay-nøjagtighed for små varianter stratificeret efter konfidensniveau og -størrelse (velkarakteriserede cellelinjeprov)er)

Variantudertype	Konfidensniveau	Overensstemmende GIAB-bestemmelser	Eksklusive GIAB-bestemmelser	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV'er	Høj	21.431.369	2.552	21.439.303	3.954	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermediær	908.172	1.259	910.058	2.175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	720.717	59.691	722.180	28.721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
Kort sletning (1-5 bp)	Høj	1.080.383	690	1.090.370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Intermediær	423.547	788	437.019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	263.828	2.624	281.217	2.088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
Medium sletning (6-15 bp)	Intermediær	142.671	238	144.997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	86.174	812	91.710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)

Variantunder-typer	Konfidenssniveau	Overensstemmende GIAB-bestemmelser	Eksklusive GIAB-bestemmelser	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Lang sletning (≥ 16 bp)	Intermediær	34.414	315	34.580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	9.985	393	10.212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Kort indsættelse (1-5 bp)	Høj	927.288	221	925.787	271	> 99,9% (> 99,9%)	> 99,9% (> 99,9%)
	Intermediær	158,346	294	137.081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	93.857	2.402	75.687	1.427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)
Medium indsættelse (6-15 bp)	Intermediær	91.117	116	89.054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Lav	37.925	745	36.670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
Lang indsættelse (≥ 16 bp)	Intermediær	11.081	46	11.110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Lav	14.086	607	14.312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

Nøjagtighed af kopinummervariant

Nøjagtigheden af CNV-bestemmelsen blev vurderet ved hjælp af den samme referencemetode og formodede sunde bloddonorprøver (195), der blev brugt til at vurdere nøjagtigheden af bestemmelsen af små varianter. Hver CNV anses for at være registreret i bestemmelsessættet, hvis mindst 50 % af denne CNV er dækket af samlingen af CNV-bestemmelser af samme type (GEVINST/TAB) i det matchede bestemmelsessæt. TruSight Whole Genome definerer et sæt genomiske områder, der er ekskluderet fra CNV-bestemmelse baseret på en

vurdering af prøvedata fra 1000 genomer og 77 formodede sunde bloddonorer ved hjælp af målinger relateret til dækningsdybdeudsving, dækningsafvigelsesudsving og mellemrum i dækningen for at fastslå områder i genomet, der ikke kan rapporteres for CNV. CNV-bestemmelse blev kun evalueret over genomiske områder, der var fælles for både referencemetoden og TruSight Whole Genome. En oversigt over nøjagtighed for alle CNV-bestemmelser vises i [Tabel 15](#) og [Tabel 16](#).

Tabel 15 TruSight Whole Genome Assay-nøjagtighed for CNV'er stratificeret efter størrelse og type

Størrelse	Type	Overensstemmende bestemmelser for referencemetode	Eksklusive bestemmelser for referencemetode	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10-25 kbp	GEVIN ST	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	TAB	4.162	457	4.155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)
25-50 kbp	GEVIN ST	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	TAB	1.587	16	1.622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50-100 kbp	GEVIN ST	228	0	187	20	> 99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	TAB	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)

Størrelse	Type	Overensstemmende bestemmelser for referencemetode	Eksklusive bestemmelser for referencemetode	Overensstemmende bestemmelser for analyse	Eksklusive bestemmelser for analyse	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
≥ 100 kbp	GEVINST	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	TAB	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
Samlet (alle CNV'er ≥ 10 kbp)	GEVINST	1.397	216	1.234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	TAB	7.013	501	7.043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tabel 16 Oversigt over TruSight Whole Genome NPA for CNV-bestemmelser

Størrelse	Type	Overensstemmende negative bestemmelser	Eksklusive negative bestemmelser for referencemetode	Eksklusive bestemmelser for analyse	NPA (LCL)
Samlet (alle CNV'er ≥ 10 kbp)	GEVINST	548.478.033.220	5.701.311	6.400.382	> 99,99 % (> 99,99 %)
	TAB	548.591.794.675	11.719.913	8.543.877	> 99,99 % (> 99,99 %)

Kørsler for nøjagtighed af homozygositet

Teknisk positiv prædiktiv værdi (TPPV) for ROH-bestemmelser blev vurderet ved hjælp af den samme referencemetode og formodet sunde bloddonorprøver (195), der blev anvendt til vurderingerne af små varianter og CNV-nøjagtighed. ROH-hændelser blev bestemt ved at identificere regioner i genomet, der

indeholdt en sekvens af homozygote SNV-bestemmelser, som manglede heterozygote SNV'er eller lange mellemrum uden varianter. Sådanne kimregioner blev derefter udvidet til venstre og højre og vurderet for omgivende homozygote bestemmelser eller tilstedeværelse af heterozygote SNV'er. ROH-hændelser påvist af TruSight Whole Genome blev sammenlignet med SNV-bestemmelser fra referencemetoden. En oversigt over TPPV for ROH-bestemmelser er vist i [Tabel 17](#).

Tabel 17 TruSight Whole Genome-nøjagtighed for ROH-hændelser stratificeret efter størrelse

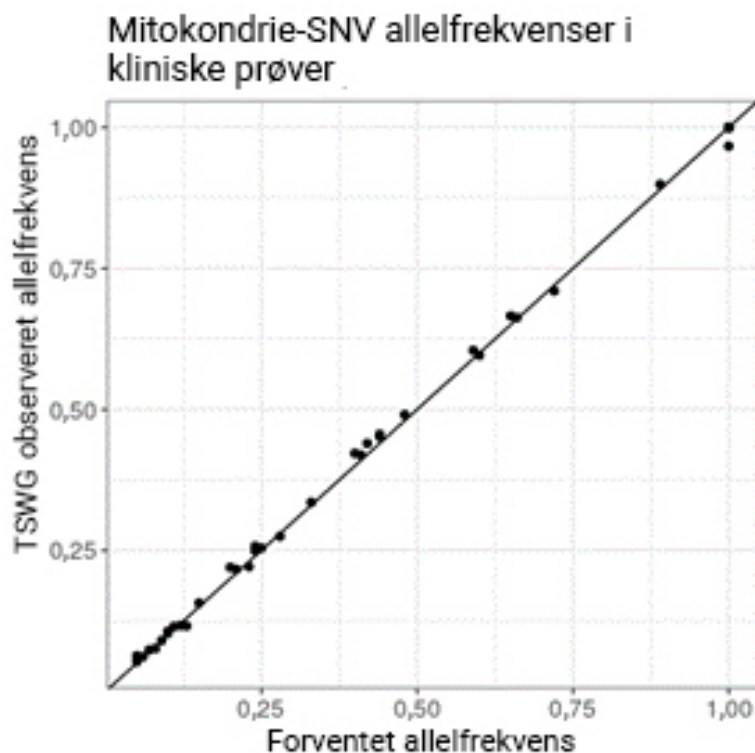
Størrelse	TPPV Mean	TPPV LCL
10-25 kbp	81,44 %	80,77 %
25-50 kbp	82,14 %	81,82 %
50-100 kbp	81,77 %	81,55 %
100-500 kbp	82,19 %	81,98 %
≥ 10 kbp	82,07 %	81,94 %
≥ 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Positiv procentvis overensstemmelse (PPA) for ROH-påvisning blev bestemt i eksterne kliniske prøver ved at sammenligne TruSight Whole Genome-bestemmelser med ROH-bestemmelser fra ortogonale metoder, herunder kromosomal mikroarray og PCR-baseret vurdering. En ROH-hændelse blev anset for at være påvist, hvis mindst 50 % af regionen, der blev rapporteret som ROH efter orthogonal metode, overlappede samlingen af ROH-hændelser bestemt af TruSight Whole Genome. PPA mellem TruSight Whole Genome Assay og ortogonale metoder var 34/34 (100 %) for alle forventede ROH-hændelser (≥ 4 Mb).

Heteroplasmisk mitokondrie SNV-nøjagtighed

Nøjagtigheden af mtSNV-bestemmelsen blev vurderet i 41 tidligere gemte kliniske prøver fra eksterne centre. Hver klinisk prøve indeholdt en tidligere rapporteret mtSNV på et defineret sted og med en defineret grad af heteroplasmie baseret på mtDNA-målet kendt analyse med heteroplasmie (MITOP). Allefrekvenser estimeret med TruSight Whole Genome var stærkt korreleret med de forventede frekvenser som forudsagt af MITOP. Alle forventede mtDNA SNV'er blev påvist, hvilket resulterede i en PPA på 100 % (41/41).

Figur 3 TruSight Whole Genome-observerede mitokondrie SNV-allelfrekvenser kontra forventet allelfrekvenser



Der blev udført en yderligere mtSNV-nøjagtighedsundersøgelse med de samme 195 blodprøver og referencemetode, som er beskrevet i undersøgelserne af nøjagtighed i små varianter og CNV. Det negative referencesæt blev defineret som sikre ikke-variante bestemmelser (PASS-filer), og det positive referencesæt blev defineret som mtSNV-bestemmelser med en allelfrekvens > 2,5 %. Positioner med enten et ikke-passeret filter eller en ikke-SNV-variantbestemmelse blev udelukket. En oversigt over nøjagtighed for mtSNV'er vises i [Tabel 18](#).

Tabel 18 TruSight Whole Genome-nøjagtighed af mtDNA SNV-bestemmelser

Nøjagtigheds måling	Referencemete overensstemmende positiv	Referencemete eksklusiv positiv	Analyse eksklusiv positiv	Referencemete overensstemmende negativ	Referencemete eksklusiv negativ	Analyse eksklusiv negativ	Nøjagtigheds-målingsværdi (LCL)
PPA	6875	0	I/T	I/T	I/T	I/T	> 99,99 % (99,96 %)
TPPV	6875	I/T	6	I/T	I/T	I/T	99,91 % (99,83 %)

Nøjagtigheds måling	Referencemete overensstemmende positiv	Referencemete eksklusiv positiv	Anal yse eksklusiv positiv	Referencemete overensstemmende negativ	Referencemete eksklusiv negativ	Anal yse eksklusiv negativ	Nøjagtigheds-målingsværdi (LCL)
NPA	I/T	I/T	I/T	3171049	24268	2056 4	99,24 % (99,23 %)

Nøjagtighed af STR-ekspansionspåvisning

Nøjagtigheden af STR-ekspansionspåvisning blev baseret på i alt 160 prøver klargjort ved ekstraktion af gDNA fra klinisk berørte personer med ekspansioner på specifikke steder, der blev bekræftet ved PCR/Repeat-Primed (RP)-PCR eller Southern Blot udført i et CLIA-laboratoriemiljø. De grænseværdier, der er fastsat i [Tabel 11](#) blev brugt til at definere STR-status for en allel ved et specifikt locus som normalt (estimeret STR-størrelse mindre end eller lig med grænseværdien) eller udvidet (større end grænseværdien).

PPA blev beregnet ved hjælp af udelukkende klinisk bekræftede prøver, NPA blev beregnet ved hjælp af udelukkende individuelle formodet sunde blodprøver, og TPPV blev beregnet på tværs af begge prøvegrupper. For alleler, hvor en klinisk bekræftet prøve ikke var tilgængelig, kunne PPA ikke beregnes. For alleler, hvor en klinisk bekræftet prøve ikke var tilgængelig, og der ikke var falsk positive bestemmelser, kunne TPPV desuden ikke beregnes. NPA blev beregnet for alle STR-ekspansioner. Antallet af testede kliniske prøver for en given STR-ekspansion og nøjagtighedsmålinger er angivet i [Tabel 19](#).

Tabel 19 TruSight Whole Genome-nøjagtighedsmålinger for STR-ekspansioner

STR-ekspansion	Testede kliniske prøver	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	I/T	I/T	> 99,99 %
AR	8	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATN1	4	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN1	7	66,67 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN10	0	I/T	I/T	> 99,99 %
ATXN2	5	80,00 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN3	9	> 99,99 %	90,00 %	99,74 %
ATXN7	2	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN7_GCC	0	I/T	I/T	> 99,99 %
ATXN8OS	0	I/T	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	I/T	I/T	> 99,99 %

STR-ekspansion	Testede kliniske prøver	PPA	TPPV	NPA
C9ORF72	21	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
CACNA1A	5	> 99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	I/T	I/T	> 99,99 %
CNBP	0	I/T	I/T	> 99,99 %
CNBP_CA	0	I/T	I/T	> 99,99 %
CNBP_CAGA	0	I/T	I/T	> 99,99 %
CSTB	0	I/T	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	I/T	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FMR1	47	> 99,9 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FXN	0	I/T	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	I/T	I/T	> 99,99 %
GLS	0	I/T	I/T	> 99,99 %
HTT	10	> 99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	I/T	I/T	> 99,99 %
JPH3	0	I/T	I/T	> 99,99 %
NIPA1	0	I/T	I/T	> 99,99 %
NOP56	0	I/T	I/T	> 99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	I/T	I/T	> 99,99 %
NOTCH2NL	0	I/T	I/T	> 99,99 %
PABPN1	0	I/T	I/T	> 99,99 %
PHOX2B	0	I/T	I/T	> 99,99 %
PPP2R2B	0	I/T	I/T	> 99,99 %
TBP	0	I/T	I/T	> 99,99 %
ALLE	160	98,12 %	92,35 %	99,94 %

Vurderingen af den samlede PPA for STR-ekspansionspåvisning på tværs af alle loci repræsenterer en god tilnærmelse af den locus-specifikke PPA ved hjælp af de tilgængelige kliniske prøver. Vurdering af PPA specifikt for FMR1 locus kan tjene som en nedre grænse for PPA af loci, der ikke var direkte profileret på grund af sin store grænseværdi for STR-størrelsesabnormitet.

Nøjagtighed af SMN1-allelpåvisning

Påvisningsnøjagtigheden for fraværet af C-allelen i SMN1 (NM_000344.3:c.840C) blev vurderet i 26 kliniske prøver fra tilfælde med diagnose på spinal muskelatrofi (SMA) og homozygot tab af exon 7 i SMN1 bekræftet ved digital dråbe-PCR eller MLPA. Påvisningsnøjagtigheden for identificeret tilstedeværelse af SMN1 c.840C-allelen blev vurderet i formodet sunde individuelle blodprøver. Hver prøve fik tildelt en enkelt statistisk måling (sand positiv (TP), falsk positiv (FP), falsk negativ (FN) eller sand negativ (TN)) baseret på den påviste tilstedeværelse (negativ SMA-status) eller fravær (positiv SMA-status) af C-allelen ved positionen c.840 på SMN1-genet sammenlignet med den forventede status. PPA-, TPPV- og NPA-estimer blev udarbejdet på tværs af både det positive og negative prøvesæt (se [Tabel 20](#)).

Tabel 20 Nøjagtighedsmålinger for påvisning af fravær af SMN1 c.840C-alleler

Nøjagtighedsmåling	TP	FP	TN	FN	Nøjagtighed af metrisk værdi
PPA	26	I/T	I/T	0	> 99,99 %
TPPV	26	0	I/T	I/T	> 99,99 %
NPA	I/T	0	195	I/T	> 99,99 %

Repeterbarhed

Intralaboratoriepræcision

Intralaboratoriepræcision blev evalueret ved hjælp af ekstraheret gDNA med en række kendte varianter på tværs af genomet. Disse omfattede mtSNV'er i nærheden af og et godt stykke over LoD, prøver indeholdende SMN1 c.840C-allelen og prøver med gentagne FMR- og HTT1-ekspansioner ved længder i nærheden af og et godt stykke over LoD. Prøverne blev testet ved hjælp af ni unikke betingelser, der var designet med tre operatører, tre biblioteksklargøringsreagenspartier, tre forbrugsstoffer til sekventering og tre sekventeringsinstrumenter.

Hver prøve blev kørt i duplikat på samme kørsel for at vurdere variation inden for kørslen, og hver testcase blev testet to gange for to kørsler pr. betingelse for variation mellem kørsler. Hver prøve blev vurderet ved hjælp af 36 observationer, og designet gav 18 frihedsgrader til at vurdere repeterbarhed. Listen over panelelementer, prøvetype og vurderede varianter pr. panelmedlem vises i [Tabel 21](#). Prøve 1-4 og 9-12 blev afledt af både mænd og kvinder af selvidentificeret kaukasiske, afrikanske og asiatiske afstamning for at give et forskelligartet prøvesæt.

Tabel 21 Prøvesammensætning af panel anvendt til undersøgelse af intralaboratoriepræcision

Panel	Prøvenr.	Prøvetype	Varianter
A	1	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	2	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	3	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	4	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	5	Konstrueret blanding af gDNA fra blod	Mitokondrie-SNV'er ved lavt LoD-niveau
	6	Konstrueret cellelinje NA20241 ¹	STR ekspanderet i FMR1-loci ved lavt LoD-niveau
	7	Konstrueret cellelinje NA20208	STR ekspanderet i HTT-loci ved lavt LoD-niveau
	8	Konstrueret cellelinje NA23686	Fravær af SMN1 c.840C

Panel	Prøvenr.	Prøvetype	Varianter
B	9	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	10	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	11	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	12	gDNA fra blod	Små varianter, CNV, ROH, STR ikke ekspanderet, tilstedeværelse af SMN1 c.840C
	13	Konstrueret blanding af gDNA fra blod	mtSNV'er ved højt LoD-niveau
	14	Konstrueret cellelinje NA07862	STR ekspanderet i FMR1-loci ved højt LoD-niveau
	15	Konstrueret cellelinje NA20253	STR ekspanderet i HTT-loci ved højt LoD-niveau
	16	Konstrueret cellelinje NA03814	Fravær af SMN1 c.840C

Højt LoD-niveau: Variant allelfrekvens ca. ved 2,0x – 4,0x LoD.

Lavt LoD-niveau: Variant allelfrekvens ca. ved 1,0x – 1,5x LoD.

¹ Resultater for NA20241 blev ikke rapporteret i endeligt antal, da det blev bestemt til at være signifikant under 1,0x LoD og derfor ikke opfyldte prøvekravene.

I den kvalitative vurdering rapporteres reproducerbarhedsmålinger, der behandler varianterne som kvalitative enheder (variant til stede eller variant ikke til stede). Forskellige definitioner af positive eller negative bestemmelser og forskellige kvalitative målinger blev vurderet og rapporteret for hver varianttype ([Tabel 22](#)). Ved vurdering af reproducerbarhed af små varianter, CNV- og ROH-bestemmelser blev variantbestemmelserne, der blev foretaget i et karakteriseringskørselsreplikant, anvendt for hver prøve, der fungerede som komparatorpunkt for alle andre replikater af den pågældende prøve i undersøgelsen.

Tabel 22 Oversigt over kvalitativ vurdering af reproducerbarhed for hver varianttype

Varianttype	Positive	Negative	Type af sammenligning	Kvalitative målinger
Små varianter	Variantbestemmelser passerer filtre	Homozygote referencebestemmelser passerer filtre	Overensstemmelse med bestemmelsessæt fra indledende karakteriseringskørsler	Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (APA) og gennemsnitlig negativ overensstemmelse (ANA)
CNV'er	CNV-bestemmelser passerer filtre	Genomiske positioner, der ikke overlapper et passerende kopinummervariantvalg	Overensstemmelse med bestemmelsessæt fra indledende karakteriseringskørsler	APA og ANA
ROH	ROH-bestemmelser	Genomiske positioner, der ikke overlapper en ROH-bestemmelse	Overensstemmelse med bestemmelsessæt fra indledende karakteriseringskørsler	APA og ANA
STR-ekspansion	Prøve med STR-ekspansion i mindst ét målrettet locus	Prøve uden ekspansioner i nogen af de målrettede loci	Overensstemmelse med prøvestatus defineret ved karakterisering af prøve ved ortogonal analyse	Procentdel positive bestemmelser (PPC) og procentdel negative bestemmelser (PNC)
Påvisning af SMN1 c.840C	Prøve uden C-allelen ved c.840-positionen af SMN1 (SMA positiv)	Prøve indeholdende mindst én kopi af C-allelen ved c.840-positionen af SMN1 (SMA negativ)	Overensstemmelse med prøvestatus defineret ved karakterisering af prøve ved ortogonal analyse	PPC og PNC

Varianttype	Positive	Negative	Type af sammenligning	Kvalitative målinger
mtSNV	Mitokondrie-SNV-bestemmelser passerer filtre	Ikke-variant position i mitokondriekromosom passerer filtre	Overensstemmelse med variant- og ikke-variantbestemmelser foretaget i ufortyndede prøver	PPC og PNC

Den kvantitative vurdering af de forskellige varianttyper involverede en variabilitetsevaluering af enten kvantitative målinger, der understøtter de kvalitative målinger, eller, i tilfælde af små varianter, af aftalemålingerne i forhold til et referencevalgsæt. Denne undersøgelse udførte både en vurdering af den samlede variabilitet i kvantitative målinger på tværs af replikater samt bidraget fra forskellige faktorer, der er inkluderet i undersøgelsen, til variabiliteten i sådanne kvantitative målinger via varianskomponentanalyse. [Tabel 23](#) sammenfatter de kvantitative målinger, der anvendes i analysen af hver varianttype, samt de faktorer, der blev vurderet for bidrag til variabilitet i den kvantitative måling.

Tabel 23 Oversigt over kvantitative målinger anvendt til vurdering af præcision for forskelsvarianttyperne

Varianttype	Kvantitative målinger	Faktorer vurderet for bidrag til variabilitet
Små varianter	APA og ANA	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, variantundertype, genomisk kontekst
CNV'er	Normaliseret dækningsdybde over CNV-område	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, variantundertype, variantlængde
ROH	ROH-score over ROH-området	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, variantundertype, variantlængde
STR-ekspansion	Estimeret STR-størrelse	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, STR-sted, STR-længde
Påvisning af SMN1 c.840C	Log-Likelihood forhold for tilstedeværelsen af referenceallelen (C) på målpositionen	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, SMA-status
Mitokondrie-SNV	Variantallelfrekvens	Operatør, biblioteksklargøringssætparti, instrument, sekventeringsforbrugsstofparti, variantposition, forventet variantallelfrekvens

Resultaterne for varianskomponentanalysen vises i [Tabel 24](#). For små varianter blev størstedelen af variansen tilskrevet residualfejl og ikke forklaret af de analyserelaterede faktorer, der er inkluderet i designet, herunder sekventeringssætparti, sekventeringsinstrument, biblioteksklargørings-sætparti, operatør og kørsel, der skulle køres. Den ene undtagelse blev observeret for SNV'er i intermediære konfidensområder, for hvilke størstedelen af variansen blev tilskrevet sekventeringssætpartiet. Generelt blev en større mængde varians tilskrevet analyserelaterede faktorer for små varianter i lavkonfidensområder i genomet. For alle andre varianttyper blev størstedelen af variansen tilskrevet residualfejl og ikke analyserelaterede faktorer. Denne undersøgelse viser, at filtrering for områder med høj og intermediær konfidens i genomet for de fleste små variantundertyper kan anvendes til at øge repeterbarheden og mindske analysens variabilitet. [Ekstern reproducerbarhed på side 63](#) giver en omfattende analyse af analysens reproducerbarhed.

Tabel 24 Resultater af undersøgelse for varianskomponentanalyse

Måling	Variantundertype	Konfidenss niveau	Rest	Sekventeringssæt parti	Kør-til-kørsel	Instrument	Biblioteks klargøringsæt parti	Operatør
APA	Kort sletning (1-5 bp)	Høj	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %
		Intermediær	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %
		Lav	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %
	Medium sletning (6-15 bp)	Intermediær	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %
		Lav	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %
	Lang sletning (16-31 bp)	Intermediær	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Lav	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Kort indsættelse (1-5 bp)	Høj	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Intermediær	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Lav	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %
	Medium indsættelse (6-15 bp)	Intermediær	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Lav	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Lang indsættelse (16-31 bp)	Intermediær	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Lav	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV		Høj	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %
Intermediær			79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
Lav			56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %
ANA	SNV	Høj	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Intermediær	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Lav	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Måling	Variantundertype	Konfidenss niveau	Rest	Sekventeringsæt parti	Kør-til-kørsel	Instrument	Biblioteks klargøringsæt parti	Operatør
Dybde	CNV GEVINST (10 kbp, 25 kbp)	I/T	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %
	CNV GEVINST (25 kbp, 50 kbp)	I/T	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %
	CNV GEVINST (50 kbp, 100 kbp)	I/T	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV GEVINST (100 kbp, 500 kbp)	I/T	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV TAB (10 kbp, 25 kbp)	I/T	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAB (25 kbp, 50 kbp)	I/T	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAB (50 kbp, 100 kbp)	I/T	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV TAB (100 kbp, 500 kbp)	I/T	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Måling	Variantundertype	Konfidenss niveau	Rest	Sekventeringssæt parti	Kør-til-kørsel	Instrument	Biblioteks klargøringsæt parti	Operatør
Score over område	ROH (1 kbp, 10 kbp)	I/T	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	I/T	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	I/T	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	I/T	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	I/T	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH \geq 500 kbp	I/T	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Måling	Variantundertype	Konfidenss niveau	Rest	Sekventeringssæt parti	Kør-til-kørsel	Instrument	Biblioteks klargøringsæt parti	Operatør
Størrelsesestimat for STR loci ¹	AFF2	I/T	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7	I/T	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_GCC	I/T	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	I/T	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	I/T	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	I/T	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	I/T	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	I/T	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	I/T	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	I/T	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	I/T	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	I/T	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	I/T	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Log-likelihood-ratio	c.840C i NA03814	I/T	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C i NA23686	I/T	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV'er nær LOD	I/T	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

¹ Varianskomponentanalyse blev ikke udført for loci, for hvilke der ikke blev observeret varians.

Indlægsseddel

Ekstern reproducerbarhed

Ekstern reproducerbarhed blev bestemt ved hjælp af et enkelt parti biblioteksklargørings- og sekventeringsreagenser på tre eksterne forsøgscentre med to operatører på hvert center. De samme prøver, der blev brugt i undersøgelsen af [Intralaboratoriepræcision på side 53 \(Tabel 21\)](#), blev brugt i reproducerbarhedsundersøgelsen med én undtagelse: prøven NA20241 blev erstattet med NA20239 for at evaluere FMR1 loci STR-ekspansionen ved lav LoD. I alt blev 16 unikke prøver testet som to underpaneler med otte unikke prøver hver (panel A og panel B) af hver operatør på hvert center. Der blev udført tre sekventeringskørsler for duplikerede biblioteker i hvert underpanel til i alt 36 sekventeringskørsler pr. unik prøve.

Prøvebeståelsesraten på tværs af 576 prøvebiblioteker med gyldige sekventeringskørsler, defineret som antallet af prøver, der bestod prøvebibliotekets QC-målinger i første forsøg, var 99,1 % (571/576; 95 % CI: 98,0 %, 99,6 %). Alle testresultater er baseret på initial testning.

Reproducerbarheden af SNV'er, indsættelser, sletninger, CNV'er og ROH blev vurderet ved at sammenligne data med et referencebestemmelsessæt baseret på normal ydeevne på tværs af tre karakteriseringskørsler ([Tabel 25](#) og [Tabel 26](#)). Reproducerbarheden af STR-ekspansioner, fraværet af SMN1 c.840C-allelen og mtSNV'er blev vurderet ved at sammenligne data med kendt status ([Tabel 27](#)).

Tabel 25 Reproducerbarhed af TruSight Whole Genome for SNV'er, CNV'er og ROH

Varianttype – stratificering	Overensstemmende positive bestemmelser ¹ / Positive bestemmelser ²			Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (%) (95 % CI) ³
	Center 1	Center 2	Center 3	
Små varianter (høj konfidens)				
SNV'er	687.996.150 /	666.509.635 /	688.001.697 /	99,9
	688.770.402	667.253.493	688.766.887	(99,9-99,9)
Indsættelser – 1-5 bp	34.087.135 /	33.025.772 /	34.089.204 /	99,9
	34.137.298	33.073.087	34.137.792	(99,9-99,9)
Sletninger – 1-5 bp	44.096.186 /	42.733.935 /	44.102.515 /	99,6
	44.255.442	42.883.089	44.256.695	(99,6-99,6)
Små varianter (intermediær konfidens)				
SNV'er	42.238.226 /	40.920.370 /	42.236.751 /	98,8
	42.737.228	41.391.560	42.725.827	(98,8-98,9)
Indsættelser – 1-5 bp	11.075.073 /	10.734.488 /	11.080.468 /	98,9
	11.204.210	10.855.790	11.204.818	(98,9-99,9)
Indsættelser – 6-15 bp	4.307.181 /	4.173.626 /	4.308.408 /	99,3
	4.339.975	4.205.261	4.340.277	(99,2-99,3)
Indsættelser – ≥ 16 bp	611.952 /	593.114 /	612.222 /	96,8
	632.214	612.877	632.498	(96,8-96,8)
Sletninger – 1-5 bp	24.571.502 /	23.814.655 /	24.586.095 /	98,9
	24.851.492	24.076.930	24.855.041	(98,9-98,9)
Sletninger – 6-15 bp	8.737.319 /	8.473.410 /	8.746.773 /	98,2
	8.900.796	8.624.403	8.902.016	(98,2-98,2)
Sletninger – ≥ 16 bp	3.590.282 /	3.481.192 /	3.594.420 /	95,0
	3.779.907	3.662.448	3.780.659	(95,0-95,0)
Små varianter (lav konfidens)				
SNV'er	78.507.103 /	76.365.789 /	78.863.977 /	81,2
	96.859.682	94.066.720	97.058.652	(81,2-81,2)

Varianttype – stratificering	Overensstemmende positive bestemmelser ¹ / Positive bestemmelser ²			Gennemsnitlig positiv overensstemmelse (%) (95 % CI) ³
	Center 1	Center 2	Center 3	
Indsættelser – 1-5 bp	17.312.805 /	16.859.987 /	17.406.355 /	89,6
	19.370.351	18.807.745	19.418.516	(89,5-89,6)
Indsættelser – 6-15 bp	5.543.985 /	5.404.652 /	5.584.241 /	85,1
	6.529.886	6.338.556	6.550.066	(85,1-85,2)
Indsættelser – ≥ 16 bp	3.284.197 /	3.205.165 /	3.314.025 /	77,0
	4.275.286	4.158.315	4.298.399	(77,0-77,0)
Sletninger – 1-5 bp	31.659.416 /	30.751.952 /	31.746.379 /	92,7
	34.194.748	33.158.757	34.226.245	(92,7-92,7)
Sletninger – 6-15 bp	9.189.220 /	8.928.794 /	9.217.516 /	92,1
	9.987.568	9.684.179	9.995.101	(92,1-92,2)
Sletninger – ≥ 16 bp	3.335.400 /	3.241.968 /	3.346.219 /	85,4
	3.909.364	3.791.331	3.912.857	(85,4-85,5)
CNV'er – gevinster ≥ 10 kbp	7.883 /	7.664 /	7.916 /	95,5
	8.275	8.012	8.282	(95,2-95,8)
CNV'er – tab ≥ 10 kbp	11.517 /	11.248 /	11.516 /	95,3
	12.089	11.777	12.113	(95,1-95,5)
ROH – ≥ 500 kbp	6.641 /	6.519 /	6.616 /	98,0
	6.765	6.663	6.756	(97,8-98,2)

¹ Samlet antal overensstemmende positive bestemmelser = forespørgsel overensstemmende positiv (QCP) + reference overensstemmende positiv (RCP).

² Samlet antal positive bestemmelser = forespørgsel overensstemmende positiv (QCP) + forespørgsel eksklusiv positiv (QEP) + reference overensstemmende positiv (RCP) + reference eksklusiv positiv (REP).

³ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson-scoremetoden.

Tabel 26 Reproducerbarhed af TruSight Whole Genome for ANA af SNV'er, CNV'er og ROH

Varianttype – stratificering	Overensstemmende negative bestemmelser ¹ / Negative bestemmelser ²			Gennemsnitlig negativ overensstemmelse (%) (95 % CI) ³
	Center 1	Center 2	Center 3	
	Små varianter (høj konfidens)	486.282.620.918 / 486.388.081.375	470.948.205.740 / 471.054.131.230	
Små varianter (intermediær konfidens)	17.249.915.828 / 17.427.817.811	16.699.106.194 / 16.874.794.553	17.253.834.878 / 17.429.035.482	99,0 (99,0-99,0)
Små varianter (lav konfidens)	24.072.615.254 / 25.608.493.410	23.454.103.344 / 24.947.163.687	24.180.801.788 / 25.695.956.102	94,0 (94,0-94,0)
CNV'er – gevinster ≥ 10 kbp	592.486.270.144 / 592.500.222.476	573.973.293.084 / 573.985.772.396	592.487.297.632 / 592.500.614.241	> 99,9 (> 99,9-> 99,9)
CNV'er – tab ≥ 10 kbp	592.548.802.882 / 592.559.825.216	574.030.570.254 / 574.041.311.257	592.547.683.360 / 592.559.141.007	> 99,9 (> 99,9-> 99,9)
ROH – ≥ 500 kbp	542.968.586.606 / 547.402.885.905	525.724.060.526 / 530.011.754.808	543.014.319.116 / 547.444.495.449	99,2 (99,2-99,2)

¹ Samlet antal overensstemmende negative bestemmelser = 2 × overensstemmende negativ (CN).

² Samlet antal negative bestemmelser = 2 × overensstemmende negativ (CN) + reference eksklusive negativ (REN) + eksklusive forespørgsel negativ (QEN).

³ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson-scoremetoden.

Tabel 27 Reproducerbarhed af TruSight Whole Genome for STR'er, SMN1 og mtSNV'er

Varianttype – stratificering	Samlet antal forventede positive bestemmelser	Positive bestemmelser			Samlet antal forventede negative bestemmelser	Negative bestemmelser			Procentdel af positive bestemmelser (%) (95 % CI) ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%) (95 % CI) ¹
		Center 1	Center 2	Center 3		Center 1	Center 2	Center 3		
STR-ekspansioner – Højt påvisningsniveau (2x-4x LOD)										
STR-ekspansioner – FMR1	35	12	11	12	I/T	I/T	I/T	I/T	100 (90,1-100)	I/T
STR-ekspansioner – HTT	36	12	12	12	I/T	I/T	I/T	I/T	100 (90,4-100)	I/T
STR-ekspansioner – FMR1 og HTT kombineret	71	24	23	24	I/T	I/T	I/T	I/T	100 (94,9-100)	I/T
STR-ekspansioner – Lavt påvisningsniveau (1x-1,5x LOD)										
STR-ekspansioner – FMR1	36	11	10	11	I/T	I/T	I/T	I/T	88,9 (74,7-95,6)	I/T
STR-ekspansioner – HTT	36	12	12	12	I/T	I/T	I/T	I/T	100 (90,4-100)	I/T

Varianttype – stratificering	Samlet antal forventede positive bestemmelser	Positive bestemmelser			Samlet antal forventede negative bestemmelser	Negative bestemmelser			Procentdel af positive bestemmelser (%) (95 % CI) ¹	Procentdel af negative bestemmelser (%) (95 % CI) ¹
		Center 1	Center 2	Center 3		Center 1	Center 2	Center 3		
STR-ekspansioner – FMR1 og HTT kombineret	72	23	22	23	I/T	I/T	I/T	I/T	94,4 % (86,6-97,8)	I/T
STR-ekspansioner – 28 primære mål STR-loci kombineret	I/T	I/T	I/T	I/T	285	96	93	96	I/T	100 (98,7-100)
Fravær af SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9-100)	100 (98,7-100)
mtSNV'er – højt niveau (2x-4x LOD)	1080	360	360	360	457.524	152.491	152.489	152.484	100 (99,6-100)	> 99,9 (> 99,9-> 99,9)
mtSNV'er – lavt niveau (1x-1,5x LOD)	1080	360	359	360	457.524	152.481	152.489	152.483	99,9 (99,5-99,9)	> 99,9 (> 99,9-> 99,9)

¹ 95 % dobbeltsidet konfidensinterval beregnet ved hjælp af Wilson Score-metoden.

Fejlfinding

Brug følgende tabel til fejlfinding af problemer i arbejdsgangen. Hvis en sekventeringskørsel eller klargøring af bibliotek mislykkes to gange, kan der være behov for yderligere fejlfinding. Kontakt Illumina teknisk support.

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Problem i kørselsoprettelse	Den tilknyttede planlagte kørsel kan ikke vælges manuelt i NovaSeq 6000Dx-kontrolsoftware efter isætning af forbrugstoffer	Forkert biblioteksør-ID blev specificeret under kørselsplanlægning	Se Kørselsrevision i Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Sekventeringsproblem	Sekventeringsfejlstatus i Illumina Run Manager	Sekventeringskørslen blev afbrudt eller mislykkedes på grund af et problem med NovaSeq 6000Dx eller håndtering af sekventeringsmaterialer	Se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105). Når problemet er løst, kan biblioteket genoprettes og resekventeres op til én gang (på grund af volumen).
		Kørslen blev fuldført, men dannede ikke klynger. Muligt problem med NovaSeq 6000Dx, problem med håndtering af sekventeringsmaterialer eller katastrofal fejl ved klargøring af bibliotek på grund af problem med reagenshåndtering eller operatørfejl (f.eks. et trin sprunget over eller supernatant kasseret i stedet for overført under størrelsesvalg)	Vurder individuelle biblioteksresultater i FLP ved qPCR for $\geq 0,94$ nM (antag 450 bp indsatsstørrelse) for at bekræfte/afbekræfte biblioteksklargøring versus sekventeringsrelaterede problemer. Hvis problemer med klargøring af bibliotek udelukkes, og der er mistanke om et sekventeringsrelateret problem, se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105). Hvis der er mistanke om et problem med klargøring af bibliotek, gennemgå Tip og teknikker på side 12 og Brugsvejledning på side 15 , før klargøring og sekventering af bibliotek gentages. Hvis der er gentagne fejl, kontakt Illumina teknisk support.

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Sekventeringsdata kan ikke overføres til server	Sekventeringsfiloverførsel til analysefejlstatus i Illumina Run Manager	Der opstod problem med strømafbrydelse eller netværksforbindelse til instrumentet eller serveren under dataoverførsel af kørslen	<p>Kontroller, om der er strømafbrydelse eller tab af instrumentets netværksforbindelse. Vent, indtil systemet er inaktivt (sekventering skal fuldføres), og gå derefter til Instrument Settings (Instrumentindstillinger), IVD SETTINGS (IVD-INDSTILLINGER) for at bekræfte forbindelsen til den angivne outputplacering ved hjælp af funktionen Gennemse.</p> <p>Hvis der er behov for yderligere fejlfinding, henvises der til Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105). Hvis filoverførslen ikke genstarter og fuldføres efter løsning af forbindelses- eller strømproblemer, kontakt Illumina teknisk support.</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Analyse kan ikke starte	Statussen Analyse ikke startet vises i Illumina Run Manager, selvom sekventeringsfiloverførsel til analyse er fuldført	Parring eller forbindelse mellem instrument og DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx blev afbrudt, eller DRAGEN-licens er udløbet.	<p>Vent på, at systemet er inaktivt (sekventering skal fuldføres), og gå derefter til DRAGEN for at bekræfte, at DRAGEN-licensen er gyldig. Hvis licensen er udløbet, kontakt Illumina. Hvis licensen er gyldig, vælg Run Self-Test (Kør selvtest). Hvis testen mislykkes, eller hvis muligheden for at køre en selvtest ikke er tilgængelig, log ind på Instrument for at kontrollere, om der er en fejl i forbindelse med serverparring. Se afsnittet Systemkonfiguration i Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Analysen bør starte automatisk, når problemet er løst. Forlad siden, og gå til fanen Active Runs (Aktive kørsler) for at bekræfte, at analysen er i gang. Kontakt Illumina, hvis problemet fortsætter.</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Analysen går i stå	Statussen Analyse i gang i Illumina Run Manager vises meget længere end forventet	Strøm eller netværksforbindelse til instrumentet eller serveren kan være blevet afbrudt, hvilket bevirker, at analysen er gået i stå	<p>Annuler analysen, og kontroller, om der er strømafbrydelse eller tab af instrumentets netværksforbindelse.</p> <p>Vent på, at systemet er inaktivt (sekventering skal fuldføres), naviger derefter til Instrument Settings (Instrumentindstillinger) (IVD SETTINGS (IVD-INDSTILLINGER)), og bekræft forbindelsen til den angivne outputplacering. Hvis yderligere fejlfinding er påkrævet, se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Når problemet er løst, genindsættes analysen i kø uden ændringer. Se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Analysefiler kunne ikke overføres	Statussen Analysefiloverførsel til lager mislykkedes vises i Illumina Run Manager	Der opstod et problem med strømafbrydelse eller netværksforbindelse til instrumentet eller serveren under overførsel af analysefil	<p>Annuller analysen, og kontroller, om der er strømafbrydelse eller tab af instrumentets netværksforbindelse.</p> <p>Vent på, at systemet er inaktivt (sekventering skal fuldføres), naviger derefter til Instrument Settings (Instrumentindstillinger) (IVD SETTINGS (IVD-INDSTILLINGER)), og bekræft forbindelsen til den angivne outputplacering. Hvis yderligere fejlfinding er påkrævet, se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105).</p> <p>Når problemet er løst, genindsættes analysen i kø uden ændringer. Se Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).</p>
Analyse mislykkes ved geindsættelse i kø	Analyse mislykkedes efter geindsættelse i kø	Hvis analysen genindsættes i kø, kan den oprindelige kørsel være blevet slettet eller arkiveret og er ikke længere på den placering, der er specificeret for den eksterne lagerplacering	Kontroller, at den oprindelige kørsel stadig er på den eksterne lagerplacering. Hvis den er arkiveret, skal den gendannes fra arkivet, og derefter skal analysen sættes i kø igen.

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
QC af sekventering mislykkes	Oversigt over QC-resultat IKKE BESTÅET for sekventering i konsolideret rapport	“Samlet % \geq Q30” under den analytiske specifikation på grund af forkert håndtering af sekventeringsmaterialer (manglende optøning eller invertering til blanding efter optøning)	Se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105). Når problemet er løst, kan biblioteket genoprettes og resekventeres op til én gang (på grund af volumen).
FASTQ QC mislykkes for alle prøver	Oversigt over FASTQ QC-resultat og oversigt over prøvebiblioteks-QC IKKE BESTÅET, med individuelle QC-målingsresultater rapporteret som ND, for alle prøver i konsolideret rapport med oversigt over sekventerings-QC-resultat BESTÅET	Indeksadaptersæt, der blev angivet under oprettelse af kørsel, er ikke justeret med det, der blev brugt under biblioteksklargøring	Se prøver for at gennemgå indeksoplysningerne, der blev brugt i analysen i IRM. Hvis der er behov for en korrektion, henvises der til Genindsæt i analysekø i Vejledning til TruSight Whole Genome Analysis Application (dokumentnr. 200049931).

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
FASTQ QC mislykkes for en eller flere prøver uden lavt kørselsresultat; ikke-indeksert samlet resultat (GB) \geq 2800 GB på S4 eller \geq 1000 GB på S2	Oversigt over FASTQ QC-resultat og oversigt over prøvebiblioteks-QC IKKE BESTÅET, med individuelle QC-målingsresultater for bibliotek rapporteret som ND, for en eller flere, men ikke alle prøver i konsolideret rapport uden lavt kørselsresultat	Fejl ved brug under biblioteksklargøring eller puljeoprettelse	<p>Vurder resterende volumen(er) i den endelige biblioteksplade (FLP) for at bekræfte fejl ved brug af udeladelse af prøver fra samlede biblioteker. Volumen gør det muligt for operatøren at genoprette og resekventere op til én gang. Alternativt kan mislykkede prøver genindsættes i kø i næste biblioteksklargøringsbatch og køres efter gennemgang af Brugsvejledning på side 15.</p> <p>Individuelle biblioteksresultater i FLP kan eventuelt vurderes ved hjælp af qPCR for \geq 0,94 nM (antag 450 bp indsatsstørrelse) for at bekræfte/afbekræfte biblioteksklargøringsrelaterede problemer. Gendinsæt mislykkede prøver i kø i næste biblioteksklargøringsbatch, og kør efter gennemgang af Brugsvejledning på side 15. Det anbefales ikke at samle biblioteker på tværs af biblioteksklargøringsbatches på grund af udsving i resultater fra batch til batch, hvilket kan resultere i højere %CV og en højere forekomst af svigtende "gennemsnitlig autosomal dækning".</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
FASTQ QC mislykkes for nogle men ikke alle prøver med lav kørselskapacitet; ikke-indeksret samlet resultat (GB) lavt, < 2800 GB på S4 eller < 1000 GB på S2	Oversigt over FASTQ QC-resultat og oversigt over prøvebiblioteks-QC IKKE BESTÅET, med individuelle QC-målingsresultater for bibliotek rapporteret som ND, for en eller flere, men ikke alle prøver i konsolideret rapport med lavt kørselsresultat	Kan angive et biblioteksklargørings- eller sekventeringsrelateret problem	<p>Vurder individuelle biblioteksresultater i FLP ved qPCR for $\geq 0,94$ nM (antag 450 bp indsatsstørrelse) for at bekræfte/afbekræfte biblioteksklargørings-versus sekventeringsrelaterede problemer.</p> <p>Hvis der er mistanke om et sekventeringsproblem, se Produktdokumentation til NovaSeq 6000Dx Instrument (dokumentnr. 200010105). Når problemet er løst, kan bibliotekerne genoprettes og gensekvenseres op til én gang (på grund af begrænset volumen).</p> <p>Hvis der er mistanke om et problem med klargøring af bibliotek, gennemgå Tip og teknikker på side 12 og Brugsvejledning på side 15, før klargøring og sekventering af bibliotek gentages. Hvis der er gentagne fejl, kontakt Illumina teknisk support.</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Biblioteks-QC mislykkes pga. lav dækning	Oversigt over QC-resultat IKKE BESTÅET for prøvebibliotek for en eller flere prøver i konsolideret rapport på grund af gennemsnitlig autosomal dækning og/eller procent af autosomer med dækning, der er større end 20X, og/eller gennemsnitlig mitokondriedækning over genom, der ikke består den analytiske specifikation	Problem(er) med prøve kvalitet eller biblioteksklargøring	<p>Udfør genkvantificering med proceskontroller for at udelukke problemer relateret til DNA-input.</p> <p>Gennemgå Tip og teknikker på side 12 og Brugsvejledning på side 15, før mislykket/mislykkede prøve(r) genindsættes i kø i næste biblioteksklargøringsbatch og køres. Hvis de(n) samme prøve(r) mislykkes flere gange, kan det indikere problem(er) med prøve kvaliteten.</p> <p>Hvis forskellige prøver mislykkes igen, kan det indikere et problem med biblioteksklargøring relateret til operatør, reagens, forbrugsvare eller udstyr. Kontakt Illumina tekniske support, hvis problemet fortsætter.</p>

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Biblioteks-QC mislykkes baseret på GC-bias	Oversigt over QC-resultat IKKE BESTÅET for prøvebibliotek for en eller flere prøver i konsolideret rapport på grund af normaliseret dækning ved 60 % til 79 % GC-beholdere og/eller normaliseret dækning ved 20 % til 39 % GC-beholdere, der ikke består den analytiske specifikation	Overdreven ELM-overførsel eller oversprunget vask, der forårsager GC-bias i dækning	Gennemgå Tip og teknikker på side 12 og Brugsvejledning på side 15 , før mislykket/mislykkede prøve(r) genindsættes i kø i næste biblioteksklargøringsbatch og køres.
Biblioteks-QC mislykkes baseret på kontaminering for en eller flere, men ikke alle prøver i kørsel	Oversigt over QC-resultat IKKE BESTÅET for prøvebibliotek for en eller flere, men ikke alle prøver i konsolideret rapport på grund af estimeret prøvekontaminering, der ikke består den analytiske specifikation	Kontamineret/kontaminerede prøve(r) eller spidser blev ikke skiftet under prøve- eller biblioteksklargøring	Gennemgå Tip og teknikker på side 12 og Brugsvejledning på side 15 , før mislykket/mislykkede prøve(r) genindsættes i kø i næste biblioteksklargøringsbatch og køres. Hvis de(n) samme prøve(r) mislykkes flere gange, kan prøve-DNA være kontamineret.

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Biblioteks-QC mislykkes baseret på kontaminering for alle prøver i kørsel	Oversigt over QC-resultat for prøvebibliotek rapporteres som IKKE BESTÅET for alle prøver i konsolideret rapport på grund af estimeret prøvekontaminering, der ikke består den analytiske specifikation	Kontamineret reagens eller spidser blev ikke skiftet under prøvefortynding eller biblioteksklargøring	Gennemgå Tip og teknikker på side 12 for at undgå kontaminering. Gendinsæt mislykkede prøver i kø i næste biblioteksklargøringsbatch, og kør med friske prøvefortyndinger og biblioteksklargøringsæt.
Oversigt over ploidiresultat ND	Oversigt over ploidiresultat rapporteret som ND (ikke bestemt) i konsolideret rapport	Køn blev opført som Ukendt under oprettelse af kørsel DRAGEN rapporterede et andet kønsploidiresultat end XX eller XY såsom XO eller XXY	Bekræft, at "Oplyste kønskromosomploidi" i konsolideret rapport var "Ukendt". Det anbefales at angive køn som "Mand" eller "Kvinde" i prøvedata, når de kendes under oprettelse af kørsel. Gennemgå outputtet for "Ploidiestimat" fra DRAGEN i den konsoliderede rapport.

Udstedelsesstype	Observation	Mulig Årsag	Anbefalet Handling
Oversigt over ploidieresultat IKKE-OVERENSSTEMMENDE	Oversigt over ploidieresultat rapporteret som IKKE-OVERENSSTEMMENDE i konsolideret rapport.	Potentielt problem med prøveombytning	Gennemse for at bekræfte, at de prøvedata, der blev indtastet under oprettelse af kørsel, var korrekte. Hvis de ikke er korrekte, skal analysen genindsættes i kø med ændringer. Hvis de er korrekte, og der er mistanke om et prøveombytningsproblem, anbefales det at genindsætte IKKE-OVERENSSTEMMENDE-prøven(/prøverne) i kø i næste biblioteksklargøringsbatch og køre dem for at undgå rapportering af forkerte resultater. Prøvesoftwaren gennemtvinger ikke fejl for en prøve med en oversigt over ploidieresultat IKKE-OVERENSSTEMMENDE.

Referencer

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, fransk CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med.* 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat.* 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Epub 21. april 2022. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Epub 24. februar 2010. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28. oktober 1998 [opdateret 16. november 2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., red. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psykiatri.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Epub 20. oktober 2015. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 21. september 2011. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet.* 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Epub 19. november 2007. PMID: 18028412.
14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Epub 30. maj 2012. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.

15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet* . 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Epub 17. september 2014. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics*. 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med*. 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet* . 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/jhg.2012.200. Epub 19. september 2012. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet*. 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* . 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Epub 16. juni 2011. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Epub 3. april 2012. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet*. 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Epub 22. juli 2019. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet*. 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 22. juli 2019. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Epub 17. marts 2003. PMID: 12640453.

Bilag A

S4 Indeksset 1

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

S4 Indeksset 2

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

S2 indekssæt 1

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

S2 Indekssæt 2

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

S2 Indekssæt 3

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

S2 Indekssæt 4

Indekspladebrønd-ID	Indeksnavn	i7 baser	i5 baser
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Bilag B

Yderligere beregninger for mulighed 1: 280 ng DNA-input for kvantitative og Qubit bredområdekvantificeringsmetoder

Beregning af koncentrationsgrænserne for DNA-stammekonzentrationen på 11,2 til 154,0 ng/μl:

Minimumskoncentration er baseret på 280,0 ng DNA-input/25,0 μl volumen = 11,2 ng/μl.

Baseret på et minimalt pipetteringsvolumen på 2,0 μl er den maksimale koncentration $280 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10 % overskud)/2,0 μl = 154,0 ng/μl, i et samlet volumen på 27,5 μl.

Eksempel på beregninger med 280,0 ng DNA-input

Anvendt eksempel på DNA-stammekonzentration = 95,0 ng/μl:

- DNA-stammevolumen (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, afrundes til 3,24 μl for nøjagtig pipettering med P-10.
- Samlet volumen af fortyndet DNA er fastsat til 27,5 μl.
- RSB-volumen (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, afrundes til 24,3 μl for nøjagtig pipettering med P-200.

Anvendt eksempel på DNA-stammekonzentration = 308,0 ng/μl:

- DNA-stammevolumen (μl) er fastsat til 2,0 μl
- Samlet volumen af fortyndet DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- RSB-volumen (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Yderligere beregninger for mulighed 2: 350 ng DNA-input for Accuclear kvantificeringsmetode med ultrahøj sensitivitet

Beregning af koncentrationsgrænserne for DNA-stammekonzentrationer på 14,0 til 192,5 ng/μl:

Minimumskoncentration er baseret på 350,0 ng DNA-input/25,0 μl volumen = 14,0 ng/μl.

Baseret på et minimalt pipetteringsvolumen på 2,0 μl er den maksimale koncentration $350 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10 % overskud)/2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Eksempel på beregninger med 350,0 ng DNA-input

Anvendt eksempel for DNA-stammekonzentration = 118,75 ng/μl:

- DNA-stammevolumen (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, afrundes til 3,24 μl for nøjagtig pipettering med P-10
- Samlet volumen af fortyndet DNA er fastsat til 27,5 μl.
- RSB-volumen (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, afrundes til 24,3 μl for nøjagtig pipettering med P-200.

Anvendt eksempel på DNA-stammekonzentration = 308,0 ng/μl:

- DNA-stammevolumen (μl) er fastsat til 2,0 μl
- Samlet volumen af fortyndet DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- RSB-volumen (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Revideringshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200050132 v00.1	Maj 2024	Korrigerede inputvolumen for Accuclear kvantificeringsmetode med ultrahøj sensitivitet.
Dokumentnr. 200050132 v00	April 2024	Oprindelig udgivelse.

Indlægsseddel

Patenter og varemærker

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

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

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

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF PRODUKTET/PRODUKTERNE, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2024 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

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

Kontaktoplysninger



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australsk sponsor

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

Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring på de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen på support.illumina.com under fanen *Documentation* (Dokumentation) for det relevante sæt.