

## Bijsluiter

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK  
UITSLUITEND VOOR EXPORT

## Beoogd gebruik

De NovaSeq 6000Dx-instrument is bestemd voor sequencing van DNA-bibliotheken bij gebruik met *in-vitro* diagnostische (IVD) assays. De NovaSeq 6000Dx-instrument is bedoeld voor gebruik met specifieke geregistreerde, gecertificeerde of goedgekeurde IVD-reagentia en analysesoftware.

## Principes van de procedure

De Illumina® NovaSeq 6000Dx-instrument is bestemd voor sequencing van DNA-bibliotheken bij gebruik met *in-vitro* diagnostische assays. De NovaSeq 6000Dx maakt voor de invoer gebruik van bibliotheken die zijn gegenereerd uit DNA waarbij monsterindexen en opnamesquenties aan geamplificeerde doelen worden toegevoegd. Monsterbibliotheken worden vastgelegd op een stroomcel en gesequencet op het instrument met behulp van SBS-chemie (sequencing by synthesis). SBS-chemie maakt gebruik van een omkeerbareterminatormethode om fluorescent gelabelde enkelvoudige nucleotidebasen te detecteren wanneer ze worden opgenomen in groeiende DNA-strengen. De realtime-analysesoftware (RTA) voert beeldanalyse en basebepaling uit en kent een kwaliteitsscore toe aan elke base voor elke sequencingcyclus. Wanneer de primaire analyse is voltooid, kan de secundaire analyse worden uitgevoerd op de meegeleverde en vereiste Illumina DRAGEN-server voor NovaSeq 6000Dx om basebepalingen te verwerken. De NovaSeq 6000Dx gebruikt verschillende toepassingen voor secundaire analyse, afhankelijk van de workflow. Voor de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing houdt de verwerking onder meer demultiplexing, generatie van FASTQ-bestanden, uitlijning, variantbepaling en generatie van VCF- en gVCF-bestanden (Variant Call Format, variantbepalingsopmaak) in. De VCF- en gVCF-bestanden bevatten informatie over kiemlijn- of somatische varianten (afhankelijk van de gekozen workflow) die op specifieke posities in een referentiegenoom worden aangetroffen.

## Dubbele werkingsmodus

De NovaSeq 6000Dx bevat een enkelvoudige opstartschijf met afzonderlijke modi voor *in vitro*diagnostiek (IVD) en uitsluitend voor onderzoeksdoeleinden (RUO). De modus wordt geselecteerd met behulp van de wisselschakelaar op het scherm Sequencing. De geselecteerde modus wordt in de interface op alle schermen duidelijk aangegeven. IVD-sequencingassays, inclusief de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing in kiemlijn- en/of somatische workflows, worden uitgevoerd in de IVD-modus. Alleen IVD-sequencingreagentia kunnen in de IVD-modus worden gebruikt. De prestatiekenmerken en beperkingen van de procedure voor de NovaSeq 6000Dx zijn vastgesteld met behulp van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing in IVD-modus.

## Beperkingen van de procedure

1. Alleen voor gebruik bij *in-vitro*diagnostiek.
2. De DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing, indien gebruikt met de NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli), is in staat om het volgende te leveren:
  - Sequencing-uitvoer:
    - $\geq 1,0$  terabases (TB) met de S2-kit
    - $\geq 3,0$  TB met de S4-kit
  - Bepalingslengte (in paired-end-run) 2 x 150 basenparen (bp).
  - Basen hoger dan Q30  $\geq 85\%$  bij een bepalinglengte van 2 x 150 bp. Minstens of meer dan 85% van de basen heeft een kwaliteitsscore op de Phred-schaal van  $\geq 30$ , wat duidt op een nauwkeurigheid van de basebepaling van meer dan 99,9%.
3. Inserties van lengte  $> 18$  bp en deleties van lengte  $> 21$  bp zijn niet gevalideerd.
4. Grote varianten, inclusief multinucleotidevarianten (MNV's) en grote indels, worden in het VCF-uitvoerbestand mogelijk gerapporteerd als afzonderlijke kleine varianten.
5. Kleine MNV's worden als afzonderlijke varianten gerapporteerd in het VCF-uitvoerbestand.
6. Deleties worden in het VCF-bestand gerapporteerd op de coördinaat van de voorgaande base per VCF-indeling. Beoordeel daarom of er aangrenzende varianten zijn voordat u meldt dat een individuele basebepaling een homozygote referentie is.
7. Germline-specifieke beperkingen:
  - De NovaSeq 6000Dx met gebruik van de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing is ontworpen om kwalitatieve resultaten te leveren voor het bepalen van germline-varianten (bijv. homozygoot, heterozygoot, wild-type).
  - Variatie in het aantal kopieën kan van invloed zijn op het feit of een variant wordt geïdentificeerd als homozygoot of heterozygoot.
  - Het systeem zal niet meer dan twee varianten op één locus rapporteren, ook niet bij aanwezigheid van variatie in het aantal kopieën.
8. Specifieke somatische beperkingen:
  - De NovaSeq 6000Dx met gebruik van de Somatic FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing is ontworpen om kwalitatieve resultaten te leveren ten behoeve van somatische variantbepaling (dwz aanwezigheid van een somatische variant).
  - De Somatic FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow kan geen onderscheid maken tussen kiemlijn- en somatische varianten. De workflow is ontworpen om varianten op een reeks variantfrequenties te detecteren, maar de variantfrequentie kan niet worden gebruikt om somatische varianten van kiemlijnvarianten te onderscheiden.

- Normaal weefsel in het monster kan de detectie van varianten beïnvloeden. De gerapporteerde detectielimiet is gebaseerd op een variantfrequentie ten opzichte van het totale DNA dat is geëxtraheerd uit zowel tumorweefsel als normaal weefsel.
- Als meer dan één variant-allel op dezelfde locus wordt bepaald, wordt geen van de allelen als doorgelaten variant gerapporteerd. In plaats daarvan wordt de volledige set allelen gerapporteerd, maar gefilterd via de multi-allelische tag.

## Kwaliteitscontroleprocedures

De NovaSeq 6000Dx-software evalueert elke run, elk monster en elke basebepaling aan de hand van kwaliteitscontrolestatistieken. De positieve en negatieve controles worden aanbevolen voor de bibliotheekpreparatie en moeten worden geëvalueerd. Evalueer de controles als volgt.

- Negatieve controle (amplificatiereagenscontrole) of andere negatieve controle – moet het verwachte resultaat opleveren. Als de negatieve controle een ander resultaat oplevert dan verwacht, is er mogelijk sprake van een fout bij het bijhouden van monsters, een onjuiste registratie van indexeringsprimers of verontreiniging.
- Positief controlemonster – moet het verwachte resultaat opleveren. Als de positieve controle een ander resultaat oplevert dan verwacht, is er mogelijk sprake van een fout bij het bijhouden van monsters of een onjuiste registratie van indexeringsprimers.

## Productonderdelen

De Illumina NovaSeq 6000Dx bestaat uit het volgende:

1. NovaSeq 6000Dx-instrument (Catalogusnr. 20068232)
2. De softwarecomponenten voor de NovaSeq 6000Dx-instrument omvatten het volgende:

Softwaretoepassing	Installatielocatie	Functie	Omschrijving
NovaSeq besturingssoftware	NovaSeq 6000Dx	Regelt de werking van het instrument	De NovaSeq besturingssoftware (NVOS) beheert de werking van het instrument tijdens sequencing en genereert beelden voor gebruik door de realtime-analysesoftware (RTA).

Softwaretoepassing	Installatielocatie	Functie	Omschrijving
Real-time Analysis Software (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Voert de primaire analyse uit	De RTA-softwaretoepassing converteert de beelden die door NVOS worden gegenereerd voor elke tegel per cyclus van de sequencingrun naar basebepalingsbestanden. De basebepalingsbestanden zijn inputs voor de toepassingsmodules op de Illumina DRAGEN-server voor NovaSeq 6000Dx. De RTA-softwaretoepassing bevat geen gebruikersinterface.
Illumina Run Manager	Illumina DRAGEN-server	Regelt het instellen en beheer van de run	Illumina Run Manager biedt gebruikers- en instrumentbeheer, host de toepassingssoftware en ondersteunt het gebruik van DRAGEN-hardwaremodules voor versnelde secundaire genomica-analyse.

## Bedieningsomstandigheden

Zie voor meer informatie over de bedieningsomstandigheden het gedeelte Milieuoverwegingen in de *Productdocumentatie voor NovaSeq 6000Dx-instrument*.

Element	Specificatie
Temperatuur	Handhaaf een laboratoriumtemperatuur van tussen de 19 °C en 25 °C (22 °C ± 3 °C). Deze temperatuur is het bedrijfstemperatuurbereik van het instrument. Zorg ervoor dat de omgevingstemperatuur tijdens het uitvoeren van een run niet meer dan ± 2 °C varieert.
Luchtvochtigheid	Zorg voor een niet-condenserende relatieve luchtvochtigheid van tussen de 20% en 80%. Het systeem moet worden gebruikt op een hoogte van 2000 meter of lager.

## Verbruiksartikelen en apparatuur

Dit gedeelte geeft een overzicht van alles wat nodig is voor een sequencing-run met de NovaSeq 6000Dx. Daaronder vallen onder andere door Illumina geleverde verbruiksgoederen en aanvullende verbruiksgoederen en apparatuur die u bij andere leveranciers moet inkopen. Deze items zijn nodig om het protocol te voltooien en om onderhoud en procedures op het gebied van probleemoplossing uit te voeren.

Voor informatie over de symbolen op verbruiksartikelen of verbruiksverpakkingen, raadpleegt u [Illumina IVD-symbolensleutel \(documentnr. 1000000039141\)](#).

## Verbruiksartikelen voor sequencing

Voor een NovaSeq 6000Dx -run zijn de volgende onderdelen nodig:

- Buffercartridge
- Clustercartridge
- Stroomcel
- Bibliotheekbuisje
- SBS-cartridge

Verbruiksartikelen voor NovaSeq 6000Dx zijn verpakt in de volgende configuraties. Elk onderdeel maakt gebruik van radiofrequentie-identificatie (RFID) voor een nauwkeurige tracement en compatibiliteit van verbruiksartikelen.

Tabel 1 Verbruiksartikelen die door Illumina moeten worden geleverd

Naam kit	Inhoud	Illumina-catalogusnummer
NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli)	S2-clustercartridge S2-stroomcel S2 SBS-cartridge	20046931
NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli)	S4-clustercartridge S4-stroomcel S4 SBS-cartridge	20046933
NovaSeq 6000Dx S2-buffercartridge	S2-buffercartridge	20062292
NovaSeq 6000Dx S4-buffercartridge	S4-buffercartridge	20062293
NovaSeq 6000Dx Bibliotheekbuisje	Enkel bibliotheekbuisje	20062290
NovaSeq 6000Dx Bibliotheekbuisje, 24 stuks	24 bibliotheekbuisjes	20062291

Wanneer u uw verbruiksartikelen ontvangt, moet u ze voor een goede werking onmiddellijk bij de aangegeven temperatuur bewaren.

Tabel 2 NovaSeq 6000Dx Kitopslag

Verbruiksartikel	Aantal	Opslagtemperatuur	Lengte	Breedte	Hoogte
Stroomcel	1	2 °C tot 8 °C	27,7 cm (10,9 inch)	17 cm (6,7 inch)	3,8 cm (1,5 inch)
Clustercartridge	1	-25 °C tot -15 °C	29,5 cm (11,6 inch)	13 cm (5,1 inch)	9,4 cm (3,7 inch)
SBS-cartridge	1	-25 °C tot -15 °C	30 cm (11,8 inch)	12,4 cm (4,9 inch)	11,2 cm (4,4 inch)

Verbruiksartikel	Aantal	Opslagtemperatuur	Lengte	Breedte	Hoogte
Buffercartridge	1	15 °C tot 30 °C	42,2 cm (16,6 inch)	20,6 cm (8,1 inch)	21,1 cm (8,3 inch)
Bibliotheekbuisje	1	15 °C tot 30 °C	4,1 cm (1,6 inch)	2,3 cm (0,9 inch)	12,4 cm (4,9 inch)

## Details van verbruiksartikelen

Ter identificatie van compatibele kitonderdelen zijn de stroomcellen en cartridges gelabeld met symbolen die de kitmodus aanduiden.

Tabel 3 Labeling betreffende compatibiliteit

Kit-modus	Markering op label	Omschrijving
S2- kitonderdelen		De S2-stroomcel genereert tot 4,1 miljard enkele bepalingen die het filter passeren met een output tot 1000 Gb bij 2 x 150 bp. De S2-stroomcel biedt snelle sequencing voor de meeste toepassingen met hoge doorvoer.
S4- kitonderdelen		De S4-stroomcel genereert tot 10 miljard enkele bepalingen die het filter passeren met een output tot 3000 Gb bij 2 x 150 bp. De S4-stroomcel is een vierbaansversie van de stroomcel die speciaal is ontworpen ter maximalisering van de output.

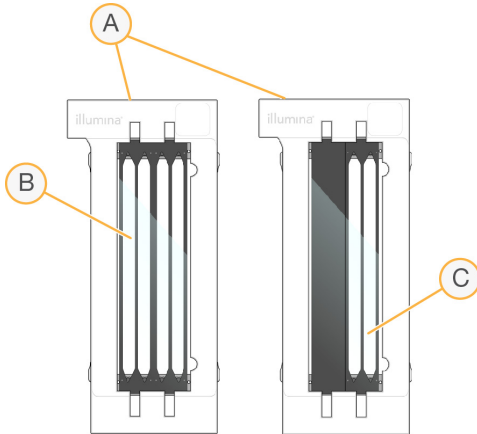
## Stroomcel

De NovaSeq 6000Dx-stroomcel is een stroomcel met patroon ingesloten in een cartridge. De stroomcel is een op glas gebaseerd substraat met miljarden nanowells in een geordende opstelling. In de nanowells worden clusters gegenereerd, van waaruit vervolgens de sequencingreactie wordt uitgevoerd.

Elke stroomcel heeft meerdere banen voor de sequencing van gepoolde bibliotheken. De S2-stroomcel heeft twee banen en de S4-stroomcel heeft er vier. Elke baan wordt in meerdere stroken afgebeeld en de software verdeelt het beeld van elke strook vervolgens in kleinere porties die tegels worden genoemd.

Een klein aantal krassen en andere kleine cosmetische defecten op de stroomcel zijn normaal en zullen naar verwachting de kwaliteit van de gegevens en de opbrengst niet in gevaar brengen. Illumina raadt aan deze stroomcel gewoon te gebruiken.

Afbeelding 1 Stroomcellen



- A. Stroomcelcartridge
- B. Stroomcel met vier banen (S4)
- C. Stroomcel met twee banen (S2)

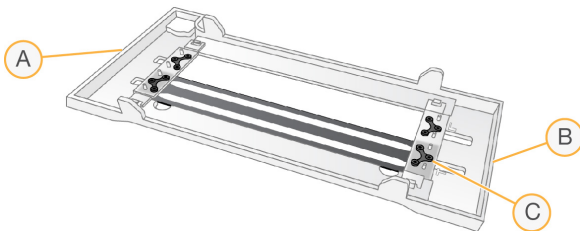
De onderkant van elke stroomcel bevat meerdere pakkingen. Bibliotheken en reagentia komen via de pakkingen aan het inlaateinde van de stroomcel de stroomcelbanen binnen. Gebruikte reagentia worden via de pakkingen aan het uitlaateinde uit de banen gedreven.



**LET OP**

Raak de pakkingen niet aan tijdens het hanteren van de stroomcel.

Afbeelding 2 Omgekeerde stroomcel



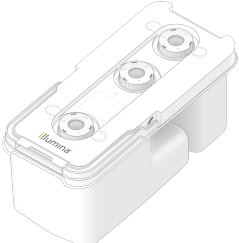


- A. Uitlaateinde
- B. Inlaateinde
- C. Pakking (één van de vier)

## Details over buffer-, cluster- en SBS-cartridges

De NovaSeq 6000Dx-buffer-, -cluster- en -SBS- cartridges hebben met folie verzegelde reservoirs die zijn gevuld met reagentia, buffers, en wasoplossing. Cluster- en SBS-cartridges zijn inbegrepen bij NovaSeq 6000Dx-reagenskits. De buffercartridge wordt apart verkocht.

De cartridges worden rechtstreeks op het instrument geladen en zijn voorzien van kleurcodes en labels om laadfouten te beperken. Geleiders in de reagenskoeler en bufferladen zorgen voor de juiste oriëntatie.

Tabel 4 NovaSeq 6000Dx-cartridges

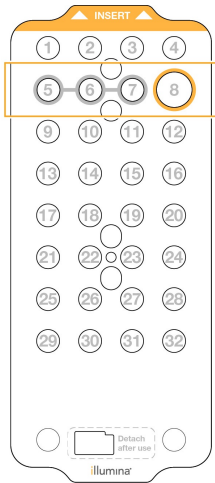
Verbruiksartikel	Omschrijving
 <p>Buffercartridge</p>	<p>Voorgevuld met sequentiebuffers en weegt tot 6,8 kg (15 lb). Een plastic handvat vergemakkelijkt het dragen, laden en uitladen.</p> <p>De buffercartridge bevat reagentia die gevoelig zijn voor licht. Bewaar de buffercontainer tot aan het gebruik in de verpakking.</p>
 <p>Clustercartridge</p>	<p>Voorgevuld met clustering-, indexerings- en paired-end-reagentia en wasoplossing. Inclusief een aangewezen positie voor het bibliotheekbuisje. Een oranje label onderscheidt de clustercartridge van de SBS-cartridge.</p> <p>Een denaturatiereagens in positie nr. 30 bevat formamide, een organisch amide en reproductief toxine. Om het veilig verwijderen van eventueel ongebruikt reagens na de sequencing-run mogelijk te maken, is dit reservoir verwijderbaar.</p>
 <p>SBS- cartridge</p>	<p>Voorgevuld met sequencingreagentia in volumes die specifiek zijn voor het aantal cycli dat de kit ondersteunt. Elk van de drie reagensposities heeft een aangrenzende positie die is gereserveerd voor de automatische wassing na de run. Een grijs label onderscheidt de SBS- cartridge van de clustercartridge.</p> <p>De SBS-cartridge bevat reagentia die gevoelig zijn voor licht. Bewaar de SBS-container tot aan het gebruik in de verpakking.</p>

## Gereserveerde clustercartridgereservoirs

Drie reservoirs zijn gereserveerd voor aangepaste primers en een lege positie is gereserveerd voor het bibliotheekbuisje. Voor de traceerbaarheid van monsters wordt het bibliotheekbuisje tijdens het opzetten van de run in de clustercartridge geladen en blijft tot het einde van de run bij de cartridge.



Afbeelding 3 Genummerde reservoirs



Tabel 5 Clustercartridge-reservoirs

Positie	Gereserveerd voor
5, 6, en 7	Optionele aangepaste primers
8	Bibliotheekbuisje

## Door de gebruiker geleverde verbruiksartikelen en apparatuur

Tabel 6 Verbruiksartikelen

Verbruiksartikel	Leverancier	Doel
Centrifugeerfles, 500 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Tween 20 verdunnen voor een onderhoudswasbeurt.
Centrifugebuis, 30 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	NaOCl verdunnen voor een onderhoudswasbeurt.
Wegwerphandschoenen, poedervrij	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Algemeen gebruik.
Isopropylalcoholdoekjes, 70% of Ethanolalcoholdoekjes, 70%	VWR, catalogusnr. 95041-714 of gelijkwaardig Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Reinigen van onderdelen voorafgaand aan een run en algemene doeleinden.
Labweefsel, pluisarm	VWR, catalogusnr. 21905-026, of gelijkwaardig	Drogen van het stroomcelplatform en algemeen gebruik.

Verbruiksartikel	Leverancier	Doel
NaOCl van reagenskwaliteit, 5%	Sigma-Aldrich, catalogusnr. 239305	Een onderhoudswasbeurt uitvoeren.
Pipettips, 2 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Pipetteren voor het verdunnen en laden van bibliotheken.
Pipettips, 20 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Pipetteren voor het verdunnen en laden van bibliotheken.
Pipettips, 200 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Pipetteren voor het verdunnen en laden van bibliotheken.
Pipettips, 1000 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Pipetteren voor het verdunnen en laden van bibliotheken.
Reagens of isopropylalcohol van spectrofotometrische kwaliteit (99%), fles van 100 ml	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Periodiek reinigen van de optische onderdelen en ondersteunen van de objectiefreinigingscartridge.
Tween 20	Sigma-Aldrich, catalogusnr. P7949	Een onderhoudswasbeurt uitvoeren.
Water van laboratoriumkwaliteit	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden	Verdunning van Tween 20 en natriumhypochloriet voor een onderhoudswasbeurt.

Tabel 7 Apparatuur

Artikel	Bron
Vriezer, -25 °C tot -15 °C	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Maatcilinder, 500 ml, steriel	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
IJsemmer	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipet, 20 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipet, 200 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Pipet, 1000 µl	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

Artikel	Bron
Koelkast, 2 °C tot 8 °C	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden
Bak, waterbaden*	Algemene leverancier van laboratoriumbenodigdheden

\* Gebruik een bak met voldoende ruimte voor twee reagenspatronen en het juiste waterniveau. Bijvoorbeeld (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm) (24 inch × 36 inch × 10 inch).

## Richtlijnen voor water van laboratoriumkwaliteit

Gebruik altijd water van laboratoriumkwaliteit of gedestilleerd water om de instrumentprocedures uit te voeren. Gebruik nooit kraanwater. Gebruik alleen water van de volgende kwaliteit of vergelijkbaar:

- Gedestilleerd water
- Illumina PW1
- 18 megohm (MΩ)-water
- Milli-Q-water
- Super-Q-water
- Water van moleculair biologische kwaliteit

## Gebruiksaanwijzing

De volgende instructies zijn bedoeld om de NovaSeq 6000Dx-instrument in IVD-modus te laten werken met behulp van de S2- of S4-kitconfiguraties.

## Een sequencingrun maken

Gebruik de volgende stappen om een run te maken met behulp van Illumina Run Manager in IVD- of RUO-modus. U kunt ook **Import Run (Run importeren)** selecteren op het tabblad Planned (Gepland) van de pagina Runs en een monsterblad importeren. Maak nieuwe runs op het instrument of door toegang te verkrijgen tot Illumina Run Manager met behulp van een browser op een netwerkcomputer.

**OPMERKING** De exacte informatie die nodig is voor elke analysetoepassing verschilt, maar het proces om een run te maken omvat de volgende stappen.

1. Selecteer op het tabblad Planned (Gepland) van het scherm Runs **Create Run (Run maken)**.
2. Selecteer een toepassing en selecteer dan **Next (Volgende)**.
3. Doorloop de instellingenschermen. Afhankelijk van uw toepassing kunnen de weergegeven schermen bestaan uit het volgende:

- **Run Settings (Runinstellingen)** – Voer de runparameters in.
  - **Sample Data (Monstergegevens)** – Voer monstergegevens handmatig in of door een CSV-bestand met monstergegevens te importeren. De namen van de monsters moeten uniek zijn.
  - **Analysis Settings (Analyse-instellingen)** – Voer instellingen in voor analyse.
4. Bekijk in het scherm Review (Controleren) de runinformatie en selecteer **Save (Opslaan)**.  
De run wordt toegevoegd aan de bovenkant van de lijst met runs op het tabblad Planned (Gepland).

## Verbruiksartikelen voorbereiden

### SBS- en clustercartridges ontdooien

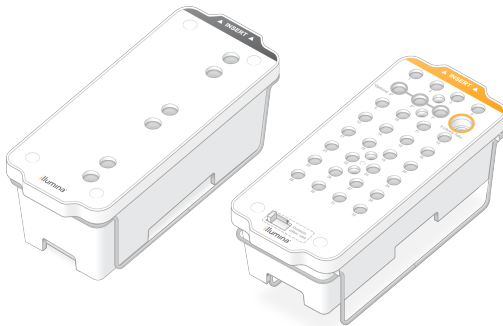


#### LET OP

Het gebruik van heet water voor het ontdooien van reagentia kan leiden tot verminderde gegevenskwaliteit of een mislukte run.

1. Als er een sequencing-run bezig is, zorg er dan voor dat beide zijden van het instrument beschikbaar zijn wanneer het ontdooien is voltooid.
2. Neem de SBS- en clustercartridges uit de opslag bij een temperatuur van -25 °C tot -15 °C.
3. Plaats elke cartridge in een draadontdooiingsrek.  
Deze rekken worden bij het instrument geleverd en voorkomen kapseizen in het waterbad.

Afbeelding 4 Cartridges in draadontdooiingsrekken



4. Gebruik de volgende tabel om de ontdooiingsduur te bepalen.

Ontdooi SBS- en clustercartridges als volgt in een waterbad bij kamertemperatuur (19 °C tot 25 °C). Dompel de cartridges tot ongeveer halverwege onder.

Cartridge	Ontdooiingsduur
S2 SBS-cartridge	4 uur
S2-clustercartridge	Maximaal 2 uur
S4 SBS- cartridge	4 uur
S4-clustercartridge	Maximaal 4 uur



### LET OP

Als de sequencing niet binnen vier uur na het ontdooien van de reagenscartridges wordt gestart, kan dit tot een verminderde gegevenskwaliteit leiden.

5. Droog de cartridgebodems grondig af met papieren handdoeken. Droog tussen de wells zodat al het water is verwijderd.
6. Controleer de folieafdichtingen op water. Als er water aanwezig is, dep dat dan droog met een pluisvrije doek.
7. Controleer de onderkant van elke cartridge om er zeker van te zijn dat de reservoirs geen ijs bevatten, wat aangeeft dat de reagentia zijn ontdooit.
8. Draai elke cartridge tien maal om, zodat de reagentia worden gemengd.



### LET OP

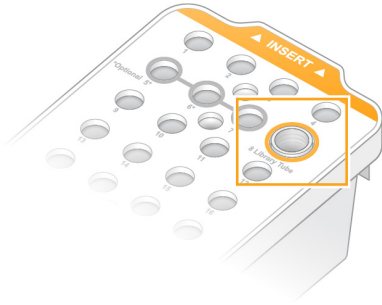
Als de cartridges niet grondig worden omgekeerd, kan dat een verminderde gegevenskwaliteit tot gevolg hebben.

9. Tik voorzichtig met de onderkant van elke cartridge op de bank om het aantal luchtbelletjes te verminderen.

## Bibliotheekbuisje laden

1. Zonder de bibliotheek aan de onderkant te verstoren, plaatst u het niet-afgedekte bibliotheekbuisje met de gedenatureerde en verdunde bibliotheekpool in de positie **Bibliotheekbuisje** (nr. 8) van de clustercartridge.
2. Plaats het bibliotheekbuisje in positie nr. 8 van de clustercartridge.

Afbeelding 5 Niet-afgedekt bibliotheekbuisje geladen in positie nr. 8

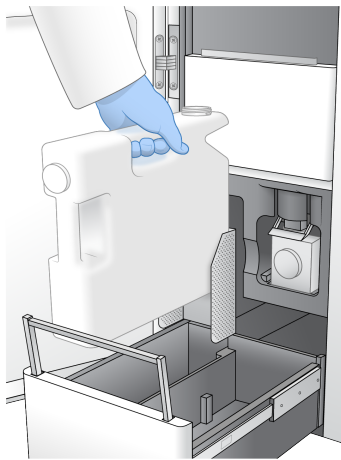


## Gebruikte reagensflesjes legen

Gebruik de volgende instructies om bij *elke* sequencing-run de gebruikte reagensflesjes te legen. Als uw systeem is geconfigureerd om gebruikte reagentia naar buiten te leiden, verzamelt het kleine flesje gebruikte reagentia en moet dat voorafgaand aan elke sequencing-run worden geleegd. De grote fles moet op zijn plaats zitten.

1. Verwijder en leeg het kleine gebruikte reagensflesje als volgt.
  - a. Til de hendel omhoog en haal het kleine gebruikte reagensflesje uit de alkoof. Pak de fles bij de zijkanten vast.
  - b. Verwijder de schroefdop uit de dophouder aan de voorkant van de fles.
  - c. Sluit de flesopening af met de dop om morsen te voorkomen.
  - d. Houd de inhoud gescheiden van de inhoud van de andere fles en gooi deze weg in overeenstemming met de in uw regio geldende normen.
  - e. Zet de niet-afgedekte fles weer in de alkoof en laat de hendel zakken. Plaats de dop op de dophouder.
2. Verwijder en leeg de grote gebruikte reagensfles als volgt.
  - a. Gebruik het bovenste handvat om de grote fles met gebruikte reagens uit de linkerkant van de bufferlade te verwijderen.
  - b. Verwijder de schroefdop uit de dophouder aan de voorkant van de fles.
  - c. Sluit de flesopening af met de dop om morsen te voorkomen.
  - d. Gooi de inhoud weg in overeenstemming met de in uw regio geldende normen. Houd beide handvatten vast tijdens het legen.
  - e. Plaats de niet-afgedekte fles terug in de bufferlade. Plaats de dop op de dophouder.

Afbeelding 6 De lege fles terugzetten



3. Trek een nieuw paar poedervrije handschoenen aan.



**LET OP**

Trek na het hanteren van de gebruikte reagensfles altijd een nieuw paar handschoenen aan.

4. Sluit de bufferlade en sluit vervolgens de deuren van het vloeistofcompartiment.



**LET OP**

Het niet legen van de gebruikte reagensflesjes kan leiden tot een afgebroken run en overloop, waardoor het instrument beschadigd raakt en er een veiligheidsrisico ontstaat.

## De stroomcel prepareren

1. Neem een nieuwe verpakte stroomcel uit de opslag van 2 °C tot 8 °C.
2. Leg de verzegelde stroomcelverpakking gedurende 10-15 minuten opzij bij omgevingstemperatuur (19 °C tot 25 °C).

Gebruik de stroomcel binnen 12 uur nadat u deze uit de verpakking hebt gehaald.

## Verbruiksartikelen laden

Gebruik de volgende instructies om het instellen van de run te starten en de verbruiksartikelen te laden.

1. Selecteer in het hoofdmenu **Sequence** en selecteer vervolgens als volgt een enkele of dubbele stroomcelrun.
  - **A+B** – Een dubbele stroomcelrun instellen.
  - **A** – Een enkele stroomcelrun opzetten aan kant A.
  - **B** – Een enkele stroomcelrun opzetten aan kant B.

Het systeem start het instellen van de run, te beginnen met het laden van de stroomcel.

2. Selecteer **OK** om de waarschuwing te bevestigen en de deur van de stroomcel te openen.



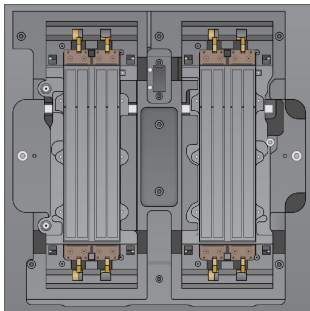
### LET OP

Houd het oppervlak vrij tijdens de sequencing-run en vermijd dat u op het instrument leunt. Druk op de deur van de doorstroomcel kan deze doen openen, waardoor de run stopt. Gestopte runs kunnen niet worden hervat.

## De stroomcel laden

1. Verwijder de gebruikte stroomcel van een vorige run, indien aanwezig.
2. Als er deeltjes zichtbaar zijn op het stroomcelplatform, reinig dan het hele platform, inclusief de vloeistofinterface en het glazen oppervlak van het optische uitlijningsdoel met een alcoholdoekje. Droog af met een pluisvrij doekje.

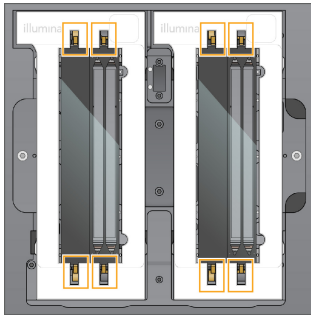
Afbeelding 7 Stroomcelplatform



3. Neem de stroomcel als volgt uit de verpakking.
  - a. Trek een nieuw paar poedervrije handschoenen aan om verontreiniging van het glazen oppervlak van de stroomcel te voorkomen.
  - b. Plaats de verpakking op een vlakke ondergrond en trek de folie open vanaf het hoeklipje.
  - c. Verwijder de doorzichtige plastic houder die de stroomcel bedekt.
  - d. Neem de stroomcel uit de verpakking. Pak de stroomcel aan de zijkanten vast, om te voorkomen dat u het glas of de pakkingen aan de onderkant aanraakt.
  - e. Als er op een van de glazen oppervlakken deeltjes zichtbaar zijn, reinigt u het betreffende oppervlak met een pluisvrij alcoholdoekje en droogt u het af met een pluisarme labdoek.
  - f. Gooi de verpakking op de juiste manier weg.
4. Lijn de stroomcel uit over de vier verhoogde klemmen en plaats deze op het stroomcelplatform.



Afbeelding 8 Geladen stroomcellen uitgelijnd over klemmen



5. Selecteer **Close Flow Cell Door** (Stroomceldeur sluiten).

De stroomceldeur gaat dicht, de sensoren en RFID worden gecontroleerd en de stroomcel-ID verschijnt op het scherm.

## De SBS- en clustercartridges laden

1. Open de deuren van het vloeistofcompartiment en open vervolgens de deur van de reagenskoeler.
2. Verwijder de gebruikte SBS- en -cluster cartridges van de vorige run, indien aanwezig.  
De gebruikte cartridges hebben geperforeerde folieverzegelingen.
3. Voer de ongebruikte inhoud af volgens de geldende normen.  
Voor het veilig verwijderen van positie 30 van de clustercartridge, zie [Positie nr. 30 losmaken op pagina 21](#).
4. Plaats de voorbereide cartridges als volgt in de reagenskoellade, zodat de etiketten van de inzetstukken naar de achterkant van het instrument zijn gericht.
  - Plaats de SBS-cartridge (grijs label) in de linkerpositie.
  - Plaats de clustercartridge (oranje label) met het niet-afgedekte bibliotheekbuisje op de juiste positie.

Afbeelding 9 Geladen reagenscartridges



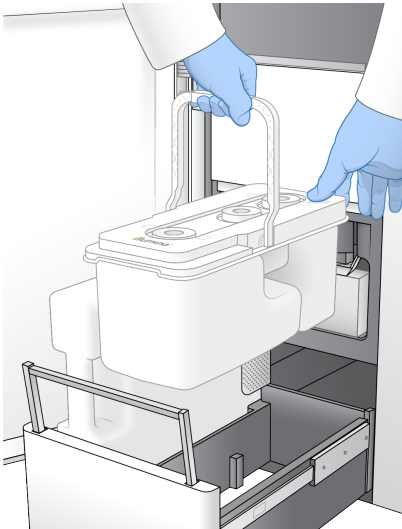
5. Schuif de lade in de koeler en sluit daarna de deur van de reagenskoeler.

De sensoren en RFID's worden gecontroleerd. De ID's van het bibliotheekbuisje en de twee cartridges verschijnen op het scherm.

## De buffercartridge plaatsen

1. Trek aan de metalen handgreep om de bufferlade te openen.
2. Verwijder de gebruikte buffercartridge vanuit de rechterkant van de bufferlade.  
De gebruikte buffercartridge heeft een doorboorde folieverzegeling.
3. Plaats een nieuwe buffercartridge in de bufferlade zodat het Illumina-label naar de voorkant van de lade is gericht. Lijn de cartridge uit met de verhoogde geleiders op de bodem en de zijkanten van de lade.  
Wanneer de buffercartridge goed is geladen, zit deze gelijkmatig op zijn plaats en kan de lade sluiten.

Afbeelding 10 De buffercartridge plaatsen



4. Als beide gebruikte reagensflesjes zijn gelegeerd, selecteer dan het selectievakje dat bevestigt dat beide gebruikte reagensflesjes leeg zijn.

**OPMERKING** Het niet legen van de gebruikte reagensflesjes kan leiden tot een afgebroken run en overloop, waardoor het instrument beschadigd raakt en er een veiligheidsrisico ontstaat.

5. Wanneer de verbruiksartikelen zijn toegevoegd, selecteert u **Run Selection** (Runselectie) om verder te gaan.

## Run selecteren en starten

Het instrument scant de ID van het bibliotheekbuisje en zoekt naar een overeenkomstige geplande run.

1. Als voor elke gebruikte zijde een geplande run wordt gevonden die overeenkomt met de ID van het bibliotheekbuisje, wordt de runselectie overgeslagen. Selecteer **Review (Controleren)** om verder te gaan.
2. Als er voor één of beide zijden geen overeenkomende run is, selecteert u **Run Selection (Runselectie)** en selecteer vervolgens een of meer geplande runs.

Dezelfde geplande run kan niet aan beide zijden worden geselecteerd.

3. Wanneer één of meer runs zijn geselecteerd, selecteert u **Pre-Run Checks (Pre-runcontroles)**.
4. Wacht ongeveer 5 minuten totdat de pre-runcontrole is voltooid.  
Na een geslaagde uitvoering start de run automatisch.

**OPMERKING** Om te voorkomen dat de harde schijf overvol raakt, moet u geen gegevens naar C:\ kopiëren nadat de run is gestart.

## Fouten in de pre-runcontrole

1. Als pre-runcontroles mislukken vanwege een sensorfout, zoals een niet-gedetectedeerde stroomcel, moet u de workflow afsluiten en opnieuw opstarten.
2. Voor andere mislukte pre-run checks, selecteert u **Retry (Opnieuw proberen)** om de mislukte controle opnieuw te starten of **Retry All (Alles opnieuw proberen)** om alle controles opnieuw te starten.  
Fouten moeten worden opgelost voordat de run kan worden gestart.
3. Selecteer het pictogram **Error (Fout)** om de details van de fout te zien.
4. Als de uitlijningscontrole mislukt, lost u de fout als volgt op.
  - a. Selecteer **Reload (Herladen)** en selecteer vervolgens **OK** om terug te keren naar het scherm Load (Laden).
  - b. Verwijder alle items van de bovenkant van het instrument, en selecteer vervolgens **OK**. De deur van de stroomcel gaat open.
  - c. Herlaad de stroomcel en selecteer dan **Run Setup (Run instellen)**.
  - d. Doorloop elk scherm om elke RFID opnieuw te lezen en keer terug naar het scherm Pre-Run Checks (Pre-runcontrole).
  - e. Voer de controle opnieuw uit.

## De voortgang van de run bewaken

De volgende details worden weergegeven op het scherm Sequencing terwijl de run bezig is. Het scherm Sequencing is toegankelijk via het hoofdmenu.

- **Status van afzonderlijke runstappen**
- **Time to completion** (Tijd tot voltooiing) — De datum en het tijdstip waarop de run klaar is (jjjj-mm-dd uu:mm).
- **Run progress** (Voortgang run) — De huidige run-stap. De grootte van de voortgangsbalk is niet evenredig aan de runsnelheid van elke stap.
- **Q-scores** — De distributie van kwaliteitsscores (Q-scores).
- **Intensity** (Intensiteit) — De waarde van clusterintensiteiten van het 90<sup>e</sup> percentiel voor elke tegel. Plotkleuren geven de rode en groene kanalen aan.

- **Clusters passing filter (%)** (Clusters die door het filter worden doorgelaten) — Het percentage van clusters die door het filter worden doorgelaten.
- **Projected Total Yield (GB)** (Verwachte totale opbrengst) — De verwachte opbrengst voor de stroomcelrun. Als de statistieken per baan zijn geselecteerd (H), zijn de weergegeven cijfers de huidige opbrengst per rijstrook en worden ze gedurende de run per cyclus bijgewerkt.
- **Q30** — Het percentage basebepalingen voor de run dat een Q-score van  $\geq 30$  heeft.

## Statuspictogrammen

Een statuspictogram op de NVOS-interface geeft de run-status aan. Een cijfer op het pictogram geeft het aantal condities voor een status weer.

Wanneer een runstatus verandert, knippert het pictogram. Selecteer het pictogram om een beschrijving van de situatie te bekijken. Selecteer **Acknowledge** (Bevestigen) om het bericht te wissen en vervolgens **Close** (Sluiten) om het dialoogvenster te sluiten.

Statuspictogram	Naam status	Omschrijving
	Status oké	Systeem werkt normaal.
	Processing (Bezig met verwerken)	Het systeem is bezig met verwerken.
	Waarschuwing	Er is een waarschuwing opgetreden en aandacht is vereist. Waarschuwingen stoppen een run niet en vereisen geen actie voordat u verder gaat.
	Fout	Er is een fout opgetreden. Foutmeldingen vereisen een actie alvorens een run kan worden voortgezet.
	Informatie	Er is een niet-kritiek bericht beschikbaar.

## Runstatistieken

De software toont statistieken die tijdens de run zijn gegenereerd. Meetgegevens verschijnen in de vorm van diagrammen, grafieken en tabellen op basis van de gegevens die door RTA3 zijn gegenereerd en naar InterOp-bestanden zijn geschreven.

Het clusteren duurt ongeveer 2 uur, daarna begint de sequencing met cyclus 1. Meetgegevens worden geüpdatet naarmate de sequencing vordert. Na cyclus 26 zijn de clusters die door het filter zijn doorgelaten, de opbrengst en de kwaliteitsscores beschikbaar. Vóór cyclus 26 worden er geen waarden ingevuld en worden deze aangeduid als niet van toepassing zijnde.

## Na sequencing

De volgende secties bevatten instructies over stappen die plaatsvinden nadat de sequencing is voltooid.

### Automatische wassing na de run

Wanneer de sequencing is voltooid, start de software een automatische wassing na de run die ongeveer 80 minuten duurt. Het systeem pompt 0,24% natriumhypochloriet (NaOCl) uit positie nr. 17 en verdunt dat tot 0,12%. De 0,12% NaOCl wordt naar de ExAmp-reagens- en bibliotheekposities gepompt, door de stroomcel, en vervolgens naar de gebruikte reagensflesjes. De wassing spoelt het sjabloon uit het systeem om kruisbesmetting te voorkomen.

Wanneer de wassing is voltooid, wordt het systeem in een veilige staat gebracht en wordt de Home-knop actief. Laat de verbruiksartikelen op hun plaats zitten tot de volgende run. Na de wassing blijven de zuigmondjes in de SBS- en cluster cartridges om te voorkomen dat er lucht in het systeem komt. De zuigmondjes in de buffer cartridge zijn verhoogd, zodat de gebruikte reagensflessen kunnen worden geleegd. Vervolgens wordt er wasbuffer door alle leidingen gepompt om de NaOCl en reagentia uit het systeem te verwijderen.

**OPMERKING** Als tijdens een automatische wassing na de run een fout optreedt en de naspoelbeurt onvolledig is, is een onderhoudsspoelbeurt vereist.

### Positie nr. 30 losmaken

Het reservoir in positie nr. 30 van de cluster cartridge bevat formamide. Dat wordt uit de gebruikte cluster cartridge verwijderd en afzonderlijk weggegooid.



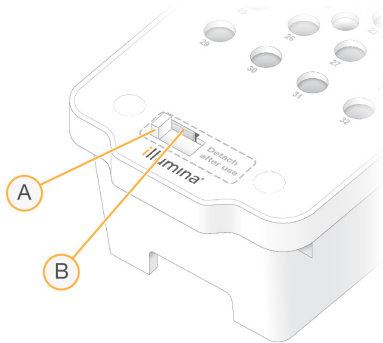
#### LET OP

**Deze set reagentia bevat mogelijk gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Draag beschermende hulpmiddelen, met inbegrip van oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas, passend bij het blootstellingsrisico. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en voer deze af in overeenstemming met de geldende regionale, nationale en lokale wet- en regelgeving. Raadpleeg voor aanvullende informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid het veiligheidsinformatieblad op [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

1. Druk, terwijl u handschoenen draagt, het witte plastic lipje met de tekst **Detach after use (Losmaken na gebruik)** naar rechts.
2. Plaats een hand of een stevige ondergrond onder het reservoir en druk het doorzichtige plastic lipje naar het Illumina-label om het reservoir van onder de cluster cartridge vandaan te halen.

**OPMERKING** Vermijd het stapelen van cluster cartridges bij het opslaan. Door stapelen kan het reservoir per ongeluk losraken.

Afbeelding 11 Verwijderbare positie nr. 30



- A. Wit plastic lipje om los te maken
- B. Doorzichtig plastic lipje om los te laten

3. Voer het reservoir af volgens de toepasselijke normen.

## Sequencinguitvoer

Tijdens sequencing worden gegevens automatisch overgedragen van de NovaSeq 6000Dx-instrument naar de Illumina DRAGEN-server. Wanneer de primaire analyse is voltooid en de overdracht van gegevens is afgerond, kan de secundaire analyse op de Illumina DRAGEN-server automatisch beginnen met behulp van de analyse-opties die zijn gedefinieerd door de toepassing die is geselecteerd in Illumina Run Manager. De resultaten die worden geproduceerd, zijn afhankelijk van de opties die zijn gekozen tijdens het instellen van de run. Om de resultaten van een run te bekijken, selecteert u de gewenste runnaam op het tabblad Completed (Voltooid) op het scherm Runs. U kunt de uitvoerbestanden ook vinden op de locatie die is opgegeven op het scherm Instrument Settings (Instrumentinstellingen).

## Realtime-analyse

Het NovaSeq 6000Dx-instrument draait RTA3, een implementatie van Realtime-analyse-software, op de Compute Engine (CE) van het instrument. RTA3 extraheert intensiteiten uit beelden die van de camera zijn ontvangen, voert basebepalingen uit, kent een kwaliteitsscore toe aan basebepalingen, lijnt uit met PhiX en rapporteert gegevens in InterOp-bestanden.

Om de verwerkingstijd te optimaliseren, slaat RTA3 informatie op in het geheugen. Als RTA3 wordt beëindigd, wordt de verwerking niet hervat en gaan alle rungegevens die in het geheugen worden verwerkt, verloren.

## RTA3 Inputs

RTA3 vereist tegelafbeeldingen in het lokale systeemgeheugen voor verwerking. RTA3 ontvangt run-informatie en opdrachten van de NVOS.

## RTA3 Outputs

Beelden voor elk kleurkanaal worden in het geheugen aan RTA3 doorgegeven als tegels. Op basis van deze beelden voert RTA3 een set van op kwaliteit beoordeelde basebepalingsbestanden en filterbestanden uit. Alle andere uitvoer is ondersteunende uitvoerbestanden.

Bestandstype	Omschrijving
Basebepalingsbestanden	Elke geanalyseerde tegel wordt opgenomen in een aaneengeschakeld basebepalingsbestand (*.cbcl-bestand). Tegels van dezelfde baan en hetzelfde oppervlak worden samengevoegd tot één cbcl-bestand voor elke baan en elk oppervlak.
Filterbestanden	Elke tegel produceert een filterbestand (*.filter) dat specificeert of een cluster door filters doorgelaten wordt.

RTA3 levert realtime statistieken van de kwaliteit van de run, opgeslagen als InterOp-bestanden, die een binaire uitvoer zijn met metingen op tegel-, cyclus- en bepalingniveau.

## Foutafhandeling

RTA3 maakt logbestanden aan en schrijft deze naar de Logs-map. Fouten worden geregistreerd in een tekstbestand in \*.log-bestandsindeling.

De volgende logbestanden worden na afloop van de bewerking naar de definitieve uitvoerbestemming verzonden:

- `info_00000.log` bevat een samenvatting van de belangrijke runvoorvallen.
- `error_00000.log` bevat de fouten die tijdens een run zijn opgetreden.
- `warning_00000.log` bevat de waarschuwingen die tijdens een run zijn opgetreden.

## Stroomceltegels

Tegels zijn kleine beeldvormingsgebieden op de stroomcel. De camera maakt één beeld van elke strook, die de software in tegels verdeelt voor RTA3-verwerking. Het totale aantal tegels is afhankelijk van het aantal banen, stroken en oppervlakken dat op de stroomcel wordt afgebeeld.

- S2-stroomcellen hebben in totaal 1408 tegels.
- S4-stroomcellen hebben in totaal 3744 tegels.

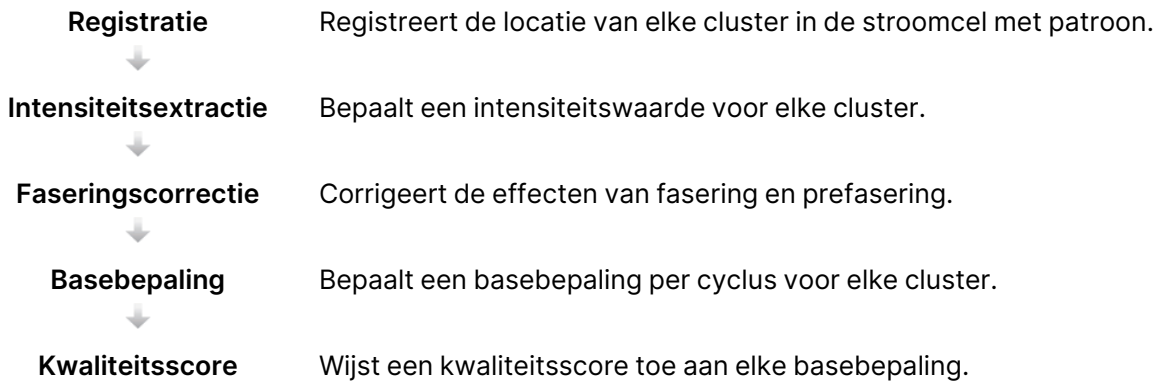
Stroomcelonderdeel	S2	S4	Omschrijving
Banen	2	4	Een baan is een fysiek kanaal met in- en uitvoerpoorten.
Oppervlakken	2	2	De S2- en S4-stroomcellen worden afgebeeld op twee oppervlakken: op de boven- en onderkant. Het bovenoppervlak van een tegel wordt eerst afgebeeld.
Stroken per baan	4	6	Een strook is een kolom in een stroomcelbaan die door de camera als één gescand beeld wordt vastgelegd.
Tegels per strook	88	78	Een tegel is een deel van een strook en geeft een afgebeeld gebied op de stroomcel weer.
Totaal aantal gegenereerde tegels	1408	3744	Banen × oppervlakken × stroken × tegels per strook is het totaal aantal tegels.

De naam van de tegel is een getal van vijf cijfers dat de tegelpositie op de stroomcel aangeeft. Zo duidt tegelnaam 1\_1205 aan: baan 1, bovenoppervlak, strook 2, tegel 5.

- Het eerste cijfer is het nummer van de baan:
  - 1 of 2 voor een S2-stroomcel.
  - 1, 2, 3, of 4 voor een S4-stroomcel.
- Het tweede cijfer duidt het oppervlak aan: 1 voor bovenzijde of 2 voor onderzijde.
- Het derde cijfer staat voor het strooknummer:
  - 1, 2, 3, of 4 voor een S2-stroomcel.
  - 1, 2, 3, 4, 5 of 6 voor een S4-stroomcel.
- De laatste twee cijfers zijn het tegelnummer. De nummering begint met 01 aan het uitlaateinde van de stroomcel en loopt door tot 88 of 78 aan het inlaateinde.
  - 01 tot en met 88 voor een S2-stroomcel.
  - 01 tot en met 78 voor een S4-stroomcel.



## Realtime analyse-workflow



### Registratie

Bij de registratie wordt een beeld uitgelijnd met de geroteerde vierkante matrix van nanowells op de stroomcel met patroon. Vanwege de geordende opstelling van de nanowells hebben de X- en Y- coördinaten voor elke cluster in een tegel een vooraf bepaalde waarde. Voor elke run worden clusterposities naar een clusterlocatiebestand (s.locs-bestand) geschreven.

Als de registratie van een van de beelden in een cyclus mislukt, worden er geen basebepalingen gegenereerd voor die tegel in die cyclus.

### Intensiteitsextractie

Na registratie berekent intensiteitsextractie een intensiteitswaarde voor elke nanowell in een bepaald beeld. Als de registratie mislukt is, kan de intensiteit voor die tegel niet geëxtraheerd worden.

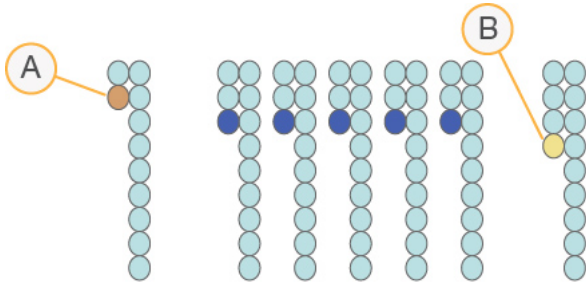
### Faseringscorrectie

Tijdens de sequencingreactie wordt elke DNA-streng in een cluster uitgebreid met één base per cyclus. Er is sprake van fasering en pefasering wanneer een streng tijdens de huidige opnamecyclus in de interfase komt.

Er is sprake van fasering wanneer een base-opname achterblijft.

Er is sprake van pefasering wanneer een base-opname vooruitloopt.

Afbeelding 12 Fasering en prefasering



- A. Bepaling met een base die faseert
- B. Bepaling met een base die prefaseert.

RTA3 corrigeert de effecten van fasering en prefasering, waardoor de gegevenskwaliteit tijdens elke cyclus van de run wordt gemaximaliseerd.

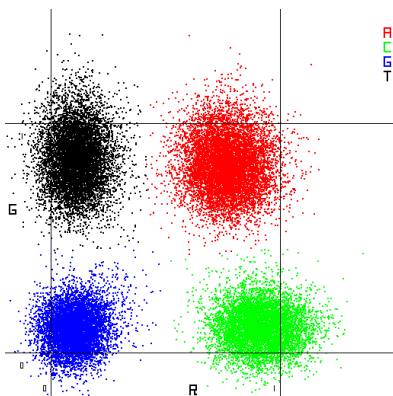
## Basebepaling

Basebepaling bepaalt een base (A, C, G of T) voor elk cluster van een bepaalde tegel in een specifieke cyclus. De NovaSeq 6000Dx-instrument maakt gebruik van sequencing met twee kanalen, waardoor slechts twee beelden nodig zijn om de gegevens voor vier DNA-basen te coderen, één beeld van het groene kanaal en één van het rode kanaal.

Een "no call" (geen bepaling) wordt aangeduid met N. No calls komt voor wanneer een cluster niet het filter passeert, de registratie mislukt of een cluster van het beeld wordt verschoven.

Intensiteiten voor elke cluster worden geëxtraheerd uit de rode en groene beelden en met elkaar vergeleken, wat vier verschillende populaties geeft. Elke populatie komt overeen met een base. Het basebepalingsproces bepaalt tot welke populatie een cluster behoort.

Afbeelding 13 Visualisering van clusterintensiteiten



Tabel 8 Basebepalingen in tweekanaalssequencing

Base	Rood kanaal	Groen kanaal	Resultaat
A	1 (aan)	1 (aan)	Clusters die intensiteit in zowel het rode als het groene kanaal vertonen.
C	1 (aan)	0 (uit)	Clusters die alleen intensiteit in het rode kanaal vertonen.
G	0 (uit)	0 (uit)	Clusters die geen intensiteit vertonen op een bekende clusterlocatie.
T	0 (uit)	1 (aan)	Clusters die alleen intensiteit in het groene kanaal vertonen.

### Clusters die door het filter worden doorgelaten

Tijdens de run filtert RTA3 onbewerkte gegevens om bepalingen die niet voldoen aan de drempelwaarde voor gegevenskwaliteit te verwijderen. Overlappende clusters en clusters van slechte kwaliteit worden verwijderd. Voor de tweekanaalsanalyse maakt RTA3 gebruik van een populatiegebaseerd systeem om de zuiverheid (intensiteitzuiverheidsmeting) van een basebepaling te bepalen. De clusters passeren het filter (PF) wanneer maximaal één basebepaling in de eerste 25 cycli een zuiverheid heeft die lager is dan een vastgestelde drempel. Indien inbegrepen wordt in cyclus 26 een PhiX-uitlijning uitgevoerd op een subset van tegels voor clusters die door het filter zijn doorgelaten. Clusters die het filter niet passeren, zijn niet basebepaald en niet uitgelijnd.

### Kwaliteitsscores

Een kwaliteitsscore (Q-score) is een voorspelling van de kans op een onjuiste basebepaling. Een hogere Q-score duidt erop dat een basebepaling van een hogere kwaliteit is en daardoor waarschijnlijk juist is. Na bepaling van de Q-score worden de resultaten geregistreerd in CBCL-bestanden.

Via de Q-score wordt op beknopte wijze de waarschijnlijkheid van kleine fouten gecommuniceerd. Kwaliteitsscores worden vermeld als Q(X), waarbij X de score is. De volgende tabel toont de relatie tussen een kwaliteitsscore en de kans op fouten.

Q-score Q(X)	Foutenkans
Q40	0,0001 (1 op 10.000)
Q30	0,001 (1 op 1000)
Q20	0,01 (1 op 100)
Q10	0,1 (1 op 10)

## Kwaliteitsscore en rapportage

Voor de kwaliteitsscore wordt voor elke basebepaling een set voorspellers berekend en vervolgens worden de voorspellende waarden gebruikt om de Q-score op te zoeken in een kwaliteitstabel. De kwaliteitstabellen zijn opgesteld om optimaal nauwkeurige kwaliteitsvoorspellingen te doen voor runs die zijn gegenereerd door middel van een specifieke configuratie van sequencingplatform en chemieversie.

De kwaliteitsscore is gebaseerd op een aangepaste versie van het Phred-algoritme.

Om de Q-tabel voor de NovaSeq 6000Dx-instrument te genereren, werden drie groepen basebepalingen bepaald, gebaseerd op de clustering van deze specifieke voorspellende kenmerken. Na groepering van de basebepalingen werd het gemiddelde foutenpercentage voor elk van de drie groepen empirisch berekend en werden de overeenkomstige Q-scores in de Q-tabel opgenomen, samen met de voorspellende kenmerken die met die groep correleerden. Er zijn dus met RTA3 maar drie Q-scores mogelijk en deze Q-scores geven het gemiddelde foutenpercentage van de groep weer. Alles bij elkaar genomen resulteert dit in vereenvoudigde, maar zeer nauwkeurige kwaliteitsscores. De drie groepen in de kwaliteitstabel komen overeen met marginale (< Q15), middelmatige (~Q20) en hoogwaardige (> Q30) basebepalingen, basebepalingen, en krijgen de specifieke scores van respectievelijk 12, 26, en 34. Verder wordt aan alle no-calls (niet-bepalingen) een nulscore van 2 toegekend. Met dit Q-score-rapportagemodel is minder opslagruimte nodig en is een lagere bandbreedte vereist zonder dat dit ten koste gaat van de nauwkeurigheid of prestaties.

Afbeelding 14 Vereenvoudigde Q-score met RTA3





## Sequencing-uitvoerbestanden

Bestandstype	Bestandsbeschrijving, locatie en naam
Basebepalingsbestanden	Elke geanalyseerde cluster wordt opgenomen in een basebepalingsbestand, samengevoegd in één bestand per cyclus, baan en oppervlak. Het samengevoegde bestand bevat de basebepaling en de gecodeerde kwaliteitsscore voor elk cluster. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, bijvoorbeeld L001_1.cbcl
Clusterlocatiebestanden	Voor elke stroomcel bevat een binair clusterlocatiebestand de XY-coördinaten voor de clusters in een tegel. De coördinaten hebben een zeshoekige layout die overeenkomt met de nanowell-layout van de stroomcel. Gegevens\Intensiteiten s_[lane].locs
Filterbestanden	Het filterbestand specificeert of een cluster door filters is doorgelaten. Filterbestanden worden bij cyclus 26 gegenereerd op basis van gegevens van 25 cycli. Voor elke tegel wordt één filterbestand gegenereerd. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Runinformatiebestand	Vermeldt de runnaam, het aantal cycli in elke bepaling, of de bepaling een indexbepaling is en het aantal stroken en tegels op de stroomcel. Het runinfobestand wordt aan het begin van de run aangemaakt. [Root folder], RunInfo.xml
Miniaturbestanden	Miniatuurafbeeldingen voor de eerste cyclus van elke sequencing-bepaling. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]—Bestanden worden voor elke cyclus opgeslagen in een submap. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg—De miniatuurafbeelding bevat het tegelnummer.


## Structuur van de sequencing-uitvoermap


De NVOS genereert automatisch de naam voor het uitvoerbestand.

 **Config** – Configuratie-instellingen voor de run.


 **Logs (Logboeken)** – Logboekbestanden die operationele stappen, instrumentanalyses en RTA3-gebeurtenissen beschrijven.

 SampleSheet.csv – Voorbeeldblad of ander bijgevoegd bestand, indien van toepassing.

 **Data (Gegevens)**


 **Intensities (Intensiteiten)**

 **BaseCalls (Basebepalingen)**


 **L00[X]** – Basebepalingsbestanden (\*.cbcl) samengevoegd in één bestand per baan, oppervlak en cyclus.

 s.locs - Het clusterlocatiebestand voor de run.

 **InterOp** – Binaire bestanden.

 **Recipe (Recept)** – Runspecifiek receptbestand.

 **Thumbnail Images (Miniatuurafbeeldingen)** – Miniatuurafbeeldingen voor elke 10<sup>e</sup> tegel.

 **LIMS** - Het installatiebestand voor de run (\*.json), indien van toepassing.

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SequenceComplete.txt

 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

 Manifest.tsv

## Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen



### LET OP

Op grond van federale Amerikaanse wetgeving mag dit apparaat alleen worden verkocht door of in opdracht van een arts of een andere beroepsbeoefenaar die daartoe bevoegd is volgens de wetgeving van de staat waarin deze persoon werkzaam is, met het oogmerk om het apparaat te gebruiken of te doen gebruiken.

- **Sommige componenten van reagentia geleverd door Illumina voor gebruik met het NovaSeq 6000Dx-instrument bevatten potentieel gevaarlijke chemicaliën. Inademen, inslikken en contact met de huid en met de ogen kunnen persoonlijk letsel tot gevolg hebben. Draag beschermende hulpmiddelen, met inbegrip van oogbescherming, handschoenen en een laboratoriumjas, passend bij het blootstellingsrisico. Behandel gebruikte reagentia als chemisch afval en voer deze af in overeenstemming met de geldende regionale, nationale en lokale wet- en regelgeving.** Raadpleeg voor informatie met betrekking tot milieu, gezondheid en veiligheid de veiligheidsinformatiebladen (SDS) op [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
- Wanneer de omschreven procedures niet worden gevolgd, kunnen de resultaten onjuist zijn of kan de monsterkwaliteit significant slechter zijn.

- Volg de standaard voorzorgsmaatregelen die in het laboratorium gelden. Pipetteer niet met de mond. Niet eten, drinken of roken in de aangegeven werkgebieden. Draag wegwerphandschoenen en laboratoriumjassen bij het hanteren van monsters en reagentia. Was uw handen grondig na het hanteren van monsters en kitreagentia.
- Goede laboratoriumpraktijken en goede laboratoriumhygiëne zijn vereist om te voorkomen dat reagentia, instrumenten en genomische DNA-monsters worden verontreinigd door PCR-producten. PCR-verontreiniging kan onnauwkeurige en onbetrouwbare resultaten veroorzaken.
- Zorg ervoor dat de pre-amplificatie- en post-amplificatiegebieden zijn voorzien van speciale apparatuur en verbruiksgoederen (bijv. pipetten, pipetpunten, verwarmingselementen, vortexers en centrifuges) om verontreiniging te voorkomen.
- Het koppelen van index en monsters moet exact overeenkomen met de lay-out van de indexplaat. De DNA Prep with Enrichment-toepassing vult automatisch de indexprimers in die aan de monsternamen zijn gekoppeld, wanneer deze tijdens het instellen van de run worden ingevoerd. De gebruiker wordt geadviseerd om voordat u de sequencingrun start te controleren of de indexprimers aan monsters zijn gekoppeld. Verkeerde combinaties tussen het monster en de lay-out van de plaat veroorzaakt een minder positieve monsteridentificatie en onjuiste resultaatrapportage.
- Installatie van door de gebruiker geleverde antivirussoftware wordt sterk aanbevolen om de computer tegen virussen te beschermen.
- Gebruik de NovaSeq 6000Dx niet als een van de panelen is verwijderd. Door het instrument te gebruiken als er panelen zijn verwijderd, ontstaat er een risico op blootstelling aan netspanning.
- Raak het plaatje van de stroomcel in het stroomcelcompartiment niet aan. De verwarming in dit compartiment werkt tussen 22 °C en 95 °C en kan brandwonden veroorzaken.
- Het instrument weegt ongeveer 480 kg (1059 lb) en kan zwaar letsel veroorzaken als het valt of verkeerd wordt behandeld.

## Prestatiekenmerken

De prestatiekenmerken voor het NovaSeq 6000Dx-instrument werden vastgesteld met de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx voor bibliotheekpreparatie, de NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli) voor sequencing, en de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing voor secundaire analyse, met inbegrip van kiemlijn- en somatische variantdetectie. De onderzoeken omvatten monsterindexering, monsteroverdracht, DNA-input, analytische gevoeligheid (blancolimiet/detectielimiet), nauwkeurigheid, precisie, methodevergelijking en reproduceerbaarheid. Zie de *Bijsluiter Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* voor prestatiekenmerken met betrekking tot pre-analytische factoren, zoals extractiemethoden of interfererende stoffen.

## Definities van berekeningen die worden gebruikt in prestatiekenmerken

1. Positieve Procentuele Overeenkomst (PPA) wordt berekend als het aandeel loci dat door een referentiemethode als varianten wordt geclassificeerd en correct door de assay wordt gerapporteerd.
  - $(\text{aantal variant-loci correct gerapporteerd door de assay}) / (\text{totaal aantal variant-loci})$Variantloci gerapporteerd door de assay die overeenkomen met de referentiemethode zijn terecht-positieven (TP's). Variantloci die door de assay als referentiebepalingen of als andere variantbepalingen worden gerapporteerd, zijn vals-negatieven (FN's).
2. Negatieve Procentuele Overeenkomst (NPA) wordt berekend als het deel van de loci die door een referentiemethode als wild-type zijn geclassificeerd en die door de assay correct worden gerapporteerd.
  - $(\text{aantal wild-type loci correct gerapporteerd door de assay}) / (\text{totaal aantal wild-type loci})$Door de assay gerapporteerde wild-type loci die overeenkomen met de referentiemethode zijn terecht-negatieven (TN's). Wild-type loci die door de assay als varianten worden gerapporteerd, zijn vals-positieven (FP's).
3. Algehele procentuele overeenkomst (OPA) wordt berekend als het aandeel van loci dat correct door de assay wordt gerapporteerd ten opzichte van een referentiemethode.
  - $((\text{aantal variant loci correct gerapporteerd door de assay}) + (\text{aantal wild-type loci correct gerapporteerd door de assay})) / ((\text{totaal aantal variant loci}) + (\text{totaal aantal wild-type loci}))$
4. De berekeningen van PPA, NPA en OPA houden geen rekening met niet-bepalingen (variant- of referentieloci die niet voldoen aan een of meer kwaliteitsfilters).
5. Percentage positieve bepalingen (PPC) is het aantal waarnemingen waarbij de variant is gedetecteerd, gedeeld door het totale aantal geteste waarnemingen, exclusief ongeldige waarnemingen of waarnemingen die als lage diepte zijn gefilterd.
6. Percentage negatieve bepalingen (PNC) is berekend als het aantal waarnemingen met een passerende referentie als resultaat op een positie, gedeeld door het totale aantal geteste waarnemingen, exclusief ongeldige waarnemingen of waarnemingen die als lage diepte zijn gefilterd.
7. Percentage autosomale bepaalbaarheid wordt berekend als het percentage niet-N-referentieposities in doelgebieden in autosomale chromosomen met een succesvolle genotypebepaling.

## Monsterindexering

Monsterindexprimers, die tijdens de preparatie van de bibliotheek worden toegevoegd, kennen aan elk DNA-monster een unieke sequentie toe. Deze unieke sequenties maken het mogelijk meerdere monsters samen te voegen in één sequencing-run. Monsterindexering wordt gebruikt voor zowel kiemlijn- als somatische workflows. Het doel van dit onderzoek was het minimum (12) en maximum (192) aantal monsters vast te stellen dat in één sequencingrun door de NovaSeq 6000Dx-instrument kan worden verwerkt. Twaalf unieke Platinum Genome DNA-monsters (NA12877–NA12888) werden getest met tenminste 12 verschillende combinaties van indexeringsprimers per monster. Monsterbibliotheken werden geprepareerd met een representatieve assay die



is ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken die 1.970.505 basen bestrijken over alle 23 menselijke chromosomen. Monsterresultaten van vier sequencing-runs met behulp van de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing werden vergeleken met Platinum Genomes-versie 2016-1.0.

Voor de eerste reeks runs werden 192 uniek geïndexeerde monsterbibliotheken gesequencet in twee sequencingruns, één elk met S2- en S4-reagentia, om zowel het maximum aantal ondersteunde indexen te verifiëren als het vermogen van de assay om voor een bepaald monster consistent een genotyperingsbepaling uit te voeren bij verschillende combinaties van indexeringsprimers. Voor de tweede reeks runs werden 12 uniek geïndexeerde monsterbibliotheken gesequencet in twee sequencingruns, één elk met S2- en S4-reagentia, om het minimumaantal ondersteunde indexen te verifiëren.

Voor de 192-indexruns varieerde de PPA voor SNV's van 99,7% tot 100%, de PPA voor inserties was 100%, de PPA voor deleties varieerde van 96,7% tot 100% en de NPA was 100%. Voor de 12-indexruns varieerde de PPA voor SNV's van 99,7% tot 100%, de PPA voor inserties varieerde van 89,6% tot 100%, de PPA voor deleties varieerde van 94,6% tot 100% en de NPA was 100%.

## Overdracht van monsters

De NovaSeq 6000Dx-instrument maakt sequencing van meerdere monsters plus controles in één sequencing-run mogelijk. Er is een onderzoek uitgevoerd om de mate van monsteroverdracht binnen een sequencing-run (within-run) en tussen sequencing-runs (run-to-run) te evalueren. Twee Platinum Genome DNA-monsters, zes mannelijke en zes vrouwelijke monsters, werden getest met een representatieve assay die is ontworpen om diverse genen te onderzoeken die 1.970.505 basen bestrijken over alle 23 menselijke chromosomen, waaronder beide geslachtschromosomen. De bibliotheken werden gesequencet op de NovaSeq 6000Dx-instrument met behulp van de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing. Overdracht van mannelijke monsters naar vrouwelijke monsters werd waargenomen door de aanwezigheid van Y-chromosoom-doelbepalingen in vrouwelijke monsters.

Overdracht binnen een run kan worden geïntroduceerd tijdens het genereren van clusters, het bepalen van de indexcyclusbase en het demultiplexen van monsters. Voor het testen van de monsteroverdracht binnen een sequencing-run werd een bibliotheekpool bestaande uit ten minste twaalf replicaten van elk uniek mannelijk en vrouwelijk monster plus twee amplificatiereagenscontroles, voor een totaal van 192 uniek geïndexeerde bibliotheken, gesequencet op de NovaSeq 6000Dx-instrument in twee sequencing-runs, elk met S2- en S4-reagentia. Monsteroverdracht binnen een run werd beoordeeld door de Y-chromosoomdoeldekking van elk vrouwelijk replicaat te vergelijken met de gemiddelde Y-chromosoomdoeldekking van alle mannelijke replicaten in de pool. Het 95e percentiel van de waargenomen overdracht binnen een run was 0,0090% en 0,041% voor respectievelijk S2- en S4-reagentia.

Voor het testen van monsteroverdracht tussen runs werden twee bibliotheekpools geprepareerd en achtereenvolgens op één NovaSeq 6000Dx-instrument gesequencet, waarbij zijde A S4-reagentia gebruikte en zijde B S2-reagentia. De eerste pool bevatte ten minste twaalf replicaten van zes unieke vrouwelijke monsters plus twee amplificatiereagenscontroles, voor een totaal van 96 uniek geïndexeerde bibliotheken. De tweede pool bevatte ten minste twaalf replicaten van zes unieke mannelijke monsters plus twee

amplificatiereagenscontroles, voor een totaal van 96 uniek geïndexeerde bibliotheken. Beide pools gebruikten dezelfde set indexadapters. De vrouwelijke pool werd eerst gesequencet, gevolgd door een sequencingrun met de mannelijke pool, gevolgd door nog een herhaalde sequencingrun van de vrouwelijke pool. De monsterverdracht tussen runs werd beoordeeld per reagentstype, S2 en S4, door vergelijking van de Y-chromosoomdoeldekking tussen overeenkomstige replicaten van de herhalingsruns van de vrouwelijke pool en de mannelijke pool. Het 95e percentiel van de waargenomen overdracht tussen runs was 0,0089% en 0,012% voor respectievelijk S2- en S4-reagentia.

## DNA-input

### Bloed (Germline)

Voor de NovaSeq 6000Dx is het bloed-DNA-invoerbereik voor de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kit met de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing vastgesteld. Dit werd geëvalueerd door een serieel verdunningsonderzoek uit te voeren met acht Platinum Genome DNA-monsters (NA12877 – NA12884) met een representatieve assay die is ontworpen om diverse genen te onderzoeken die 1.970.505 basen over alle 23 menselijke chromosomen bestrijken. De bibliotheken werden gesequencet op één NovaSeq 6000Dx-instrument met één partij elk van NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli).

Zeven monsters zijn dubbel getest op zes DNA-inputniveaus, variërend van 1000 ng tot 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, en 10 ng). Een achtste monster (NA12884) werd als een enkel replicaat getest bij 10 ng input en in tweevoud voor alle andere inputniveaus. Voor de bepaling van de nauwkeurigheid zijn de genotypen van de monsters vergeleken met Platinum Genomes-versie 2016-1.0. De resultaten werden bepaald voor elk inputniveau. De PPA voor elk varianttype (SNV's, inserties en deleties) wordt weergegeven in [PPA-resultaten voor elke bloed-DNA-input per varianttype op pagina 34](#). De NPA wordt weergegeven in [NPA voor elke bloed-DNA-input op pagina 35](#). Alle inputniveaus hadden een vergelijkbare nauwkeurigheid. De aanbevolen bloed-DNA-input voor de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx is 50-1000 ng, waarbij 1000 ng en 10 ng een boven- en ondergrens vormen om aan de prestatiekenmerken te voldoen bij sequencing op de NovaSeq 6000Dx.

Tabel 9 PPA-resultaten voor elke bloed-DNA-input per varianttype

DNA-input (ng)	Varianttype	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1000		74112	73	7	99,9	

DNA-input (ng)	Varianttype	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA (%)
10	Insertie	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50			2914	8	6	99,7
100			2917	6	5	99,8
250			2928	0	0	100
1000			2921	5	2	99,8
10	Deletie	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50			2207	3	30	99,9
100			2199	1	40	>99,9
250			2201	0	39	100
1000			2195	2	43	99,9

Tabel 10 NPA voor elke bloed-DNA-input

DNA-input (ng)	TN	FP	Referentie zonder bepalingen	NPA (%)
10	115449045	384	285751	>99,9
25	123012157	415	438153	>99,9
50	122985299	369	465043	>99,9
100	122976660	321	473730	>99,9
250	122971099	331	479289	>99,9
1000	122978527	324	471882	>99,9

## FFPE (Somatisch)

Voor de NovaSeq 6000Dx is het invoerbereik van in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) DNA voor de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kit met behulp van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing vastgesteld. Dit werd geëvalueerd door een serieel verdunningsonderzoek uit te voeren met twee Platinum Genome-monsters met een representatieve assay die is ontworpen om diverse genen te onderzoeken die 1.970.505 basen over alle 23 menselijke chromosomen bestrijken. De bibliotheken werden gesequencet op één NovaSeq 6000Dx-instrument met één partij elk van NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagents v1.5 kit (300 cycli).

DNA van monster GM12877 werd verdund met DNA van monster GM12878 om GM12877-13 te creëren met unieke GM12877 heterozygote en homozygote varianten met frequenties in de buurt van respectievelijk 6,5% en 13%. Onverdunde GM12877 werd ook getest. GM12877-13 werd dubbel getest op vier DNA-inputniveaus, variërend van 1000 ng tot 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng en 25 ng). GM12877 werd als een enkel replicaat getest bij 250 ng input en in tweevoud voor alle andere inputniveaus. Voor de bepaling van de nauwkeurigheid

zijn de variantbepalingen van de monsters vergeleken met Platinum Genomes-versie 2016-1.0. De resultaten werden bepaald voor elk inputniveau. De PPA voor elk varianttype (SNV's, inserties en deleties) wordt weergegeven in [PPA-resultaten voor elke FFPE-DNA-input per varianttype en doel-VAF op pagina 36](#). De NPA wordt weergegeven in [NPA voor elke FFPE DNA-input op pagina 36](#). Alle inputniveaus hadden een vergelijkbare nauwkeurigheid. Voor FFPE-monsters met een  $\Delta Cq$ -waarde van  $\leq 5$  is de aanbevolen DNA-input voor de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kit 50-1000 ng, waarbij 1000 ng en 25 ng een boven- en ondergrens vormen om aan de prestatiekenmerken te voldoen bij sequencing op de NovaSeq 6000Dx.

Tabel 11 PPA-resultaten voor elke FFPE-DNA-input per varianttype en doel-VAF

DNA-input (ng)	Varianttype	Verwachte varianten	Doelverdunding VAF								
			0,065				0,13				
			TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA (%)	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	Insertie	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Deletie	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tabel 12 NPA voor elke FFPE DNA-input

DNA-input (ng)	Verwachte wild-type	TN	FP	Referentie zonder bepalingen	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	>99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	>99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	>99,9
1000	29030903	29030596	307	1822781	>99,9

## Analytische gevoeligheid (Limit of Blank, [LoB] blancolimiet en Limit of Detection, [LoD] detectielimiet)

Deze studie werd uitgevoerd om de blancolimiet (LoB) en detectielimiet (LoD) voor de Somatic FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing op de NovaSeq 6000Dx-instrument te evalueren. Voor dit onderzoek werd gebruikgemaakt van een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 1.970.505 basen in alle 23

menselijke chromosomen. Platinum Genome-cellijnen GM12878 en GM12877 werden gefixeerd in formaline en ingebed in paraffine, waarna er DNA werd geëxtraheerd. Verdunningen van GM12877 in GM12878 werden geprepareerd om monsters te maken met 0%, 4%, 6,5% en 13% GM12877 per volume, waarbij de variantfrequenties van 489 unieke GM12877-varianten (454 SNV's, 17 inserties en 18 deleties) tussen 0 en 0,13 lagen. Monsterbibliotheken werden geprepareerd met twee partijen Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kitreagentia en gedurende zes opeenvolgende startdagen gesequencet met twee NovaSeq 6000Dx-instruments en twee partijen elk van NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli), voor in totaal twaalf sequencing-runs. Dit resulteerde in 288 waarnemingen voor elke variant in elk van de monsterverdunningen. De LoB en LoD werden berekend met behulp van de klassieke benadering vermeld in CLSI EP17-A2. De LoB en LoD werden voor S2- en S4-reagentia afzonderlijk berekend door de variantfrequenties van alle varianten in de sequencingrun voor elk reagentstypen samen te voegen. De Type I-fout werd gedefinieerd als 0,01 en de Type II-fout als 0,05.

De LoB werd voor 489 loci onafhankelijk geëvalueerd in twee sequencingpartijen voor elk reagentstypen (S2 of S4) en bibliotheekpreparaat. Voor S2-reagentia was de 95e percentiel LoB 2,9%. Voor S4-reagentia was de 95e percentiel LoB 2,2%.

De LoD werd met succes berekend voor 478 van de 489 varianten voor S2 en 485 van de 489 varianten voor S4. De varianten waarbij voor één of beide bibliotheekpreparaten geen LoD werd vastgesteld, werden uitgesloten van de definitieve toekenning van LoD voor het NovaSeq 6000Dx-systeem. De LoD van het NovaSeq 6000Dx-systeem met S2- en S4-reagentia werd bepaald door het 95e percentiel van de LoD's van de afzonderlijke varianten te nemen. Voor S2-reagentia was het 95e percentiel over 478 variant-LoD's 4,8%. Voor S4-reagentia was het 95e percentiel over 485 variant-LoD's 3,9%.

# Nauwkeurigheid

## Kiemlijn

De volgende studie werd uitgevoerd om de nauwkeurigheid van de variantbepaling van de Germline FASTQ- en VCF-generatie analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing op de NovaSeq 6000Dx-instrument met behulp van de NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) te beoordelen. Vier unieke Platinum Genome DNA-monsters werden getest met een representatieve assay die is ontworpen om een verscheidenheid aan genen te doorzoeken die 1.970.505 basen (9.232 targets) op alle 23 menselijke chromosomen omvatten. Elk van de monsters werd getest in replicaten van 12, behalve NA12880, die in replicaten van 11 werden getest. In totaal zijn 18 runs uitgevoerd met drie sequencing-instrumenten, drie partijen S2-reagentia en drie operatoren gedurende zes startdagen. De nauwkeurigheid werd bepaald voor SNV's, inserties en deleties door de resultaten te vergelijken met de Platinum Genomes versie 2016-1.0.

Tabel 13 Samenvatting van de kiemlijnovereenkomst

Criteria	Totaal aantal waarnemingen <sup>1</sup>	Resultaat per waarneming <sup>2</sup>	Resultaat per run <sup>3</sup>
PPA voor SNV	846	99,8	99,9
PPA voor inserties	846	97,9	>99,9
PPA voor deleties	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Berekend als aantal monsters per run (47) x aantal runs (18) = 846.

<sup>2</sup>Laagste waargenomen waarde per monsterreplicaat in alle 18 runs.

<sup>3</sup>Laagste waarde wanneer de gegevens van elke run samen worden geanalyseerd.

[Kiemlijnovereenkomst per monster op pagina 39](#) bevat de onderzoeksgegevens die worden gepresenteerd met positieve en negatieve procentuele overeenkomst per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met Platinum Genomes-versie 2016-1.0 voor PPA-berekeningen. De drie varianttypen (SNV's, inserties en deleties) worden gecombineerd. Omdat de referentiemethode alleen resultaten oplevert voor de enkelvoudige nucleotide-varianten en inserties/deleties, worden niet-variantebaseresultaten vergeleken met build hg19 van de referentiesequentie van het menselijk genoom voor NPA-berekeningen.

Tabel 14 Kiemlijovereenkomst per monster

Monster	Autosoom bepaalbaarheid	Verwachte varianten <sup>1</sup>	TP	FN	Variant zonder bepalingen	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Totaal aantal varianten in alle monsterreplicaten in 18 runs.

[Kiemlijovereenkomst per monster en varianttype op pagina 39](#) bevat de onderzoeksgegevens gepresenteerd per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met de goed gekarakteriseerde samengestelde referentiemethode. De detectie werd voor elk varianttype (SNV's, inserties en deleties) afzonderlijk geëvalueerd. Referentieposities zijn uitgesloten.

Tabel 15 Kiemlijovereenkomst per monster en varianttype

Monster	SVN's			Inserties			Deleties		
	Verwacht	TP	FN	Verwacht	TP	FN	Verwacht	TP	FN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

De monsters werden verder geanalyseerd op het bepalen van kleine inserties en deleties (indels). Een algemene samenvatting wordt gegeven in [Samenvatting van detectie van kiemlijnindel op pagina 39](#). Er waren in totaal 210 indels, variërend in grootte van 1-18 bp voor inserties en 1-21 bp voor deleties.

Tabel 16 Samenvatting van detectie van kiemlijnindel

Varianttype	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA
Insertie	36954	36953	1	0	>99,9
Deletie	29358	28986	16	356	99,9

De representatieve assay bestond uit 9.232 doelen met een verscheidenheid aan genomische inhoud. De GC-inhoud van de doelen varieerde van 0,20–0,86. Doelen hadden ook een reeks van enkele nucleotide- (bijv. PolyA, PolyT), dinucleotide- en trinucleotideherhalingen. Gegevens die per chromosoom zijn verzameld om het effect van de genomische inhoud op het percentage correcte bepalingen te bepalen, worden gepresenteerd in [Nauwkeurigheid op kiemlijinchromosoomniveau op pagina 40](#). Het percentage correcte bepalingen bestaat uit variant- en referentiebepalingen en is lager dan 100% als er onjuiste of geen bepalingen zijn.

Tabel 17 Nauwkeurigheid op kiemlijinchromosoomniveau

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucleotide (22), Trinucleotide (8), Insertie (18), Deletie (4)	[0,22 - 0,8]; Mediaan: 0,51	114888718	34	966860	>99,9	0,83
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucleotide (22), Trinucleotide (8), Insertie (5), Deletie (2)	[0,24 - 0,81]; Mediaan: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35



Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucleotide (12), Trinucleotide (6), Insertie (11), Deletie (1)	[0,25 - 0,86]; Mediaan: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucleotide (5), Trinucleotide (5), Insertie (2), Deletie (2)	[0,27 - 0,77]; Mediaan: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleotide (10), Trinucleotide (8), Insertie (8), Deletie (18)	[0,29 - 0,79]; Mediaan: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucleotide (18), Trinucleotide (11), Insertie (4), Deletie (2)	[0,24 - 0,79]; Mediaan: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleotide (31), Trinucleotide (5), Insertie (1), Deletie (4)	[0,2 - 0,77]; Mediaan: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (9), Insertie (4), Deletie (1)	[0,26 - 0,78]; Mediaan: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucleotide (9), Trinucleotide (9), Insertie (4), Deletie (1)	[0,27 - 0,83]; Mediaan: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucleotide (16), Trinucleotide (6), Insertie (1), Deletie (1)	[0,23 - 0,78]; Mediaan: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleotide (26), Trinucleotide (7), Insertie (2), Deletie (2)	[0,28 - 0,8]; Mediaan: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucleotide (7), Trinucleotide (7), Insertie (1), Deletie (5)	[0,26 - 0,77]; Mediaan: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleotide (6), Trinucleotide (8), Insertie (14), Deletie (0)	[0,28 - 0,79]; Mediaan: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucleotide (6), Trinucleotide (6), Insertie (4), Deletie (1)	[0,29 - 0,77]; Mediaan: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucleotide (8), Insertie (4), Deletie (6)	[0,29 - 0,76]; Mediaan: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (10), Insertie (15), Deletie (21)	[0,3 - 0,76]; Mediaan: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucleotide (13), Trinucleotide (6), Insertie (18), Deletie (16)	[0,28 - 0,82]; Mediaan: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucleotide (10), Insertie (4), Deletie (0)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (7), Insertie (2), Deletie (21)	[0,33 - 0,83]; Mediaan: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucleotide (9), Insertie (5), Deletie (0)	[0,31 - 0,84]; Mediaan: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucleotide (5), Insertie (2), Deletie (5)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (6), Insertie (6), Deletie (0)	[0,27 - 0,74]; Mediaan: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucleotide (5), Trinucleotide (23), Insertie (3), Deletie (0)	[0,2 - 0,72]; Mediaan: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertie (0), Deletie (0)	[0,4 - 0,59]; Mediaan: 0,45	0	0	0	N.v.t.	N.v.t.

De sequencingresultaten voor monster NA12878 werden vergeleken met een genotype met hoge betrouwbaarheid voor NA12878, vastgesteld door de National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Van de 9.232 doelen waren 8.009 doelen volledig aanwezig in de zeer betrouwbare genomgebieden, 776 doelen hadden een gedeeltelijke overlap en 447 doelen hadden geen overlap



in de NIST-sequentie. Dit resulteerde in 1.831.483 coördinaten per replicaat ter vergelijking. Niet-variante basebepalingen werden vergeleken met build 19 van het humane referentiegenoom. De nauwkeurigheidresultaten worden getoond in [Kiemlijnovereenkomst van NA12878-monster met NIST-database op pagina 49](#).

Tabel 18 Kiemlijnovereenkomst van NA12878-monster met NIST-database

Monster	Aantal doelen gedekt	Autosoom bepaalbaarheid	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Op basis van de gegevens van dit kiemlijnonderzoek met 18 runs kan de NovaSeq 6000Dx-instrument consequent sequenties bepalen voor:

- GC-inhoud  $\geq 20\%$  (alle bepaalde basen in 1692 gesequencete doelgebieden met 20% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0%)
- GC-inhoud  $\leq 86\%$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 86% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0%)
- PolyA-lengten  $\leq 46$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 46 PolyA-herhalingen correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,27%)
- PolyT-lengten  $\leq 40$  (13384074 uit 13384321 bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 40 PolyT-herhalingen correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,26%)
- PolyG-lengten  $\leq 11$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 11 PolyG-herhalingen correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0%)
- PolyC-lengten  $\leq 8$  (9815030 uit 9815035 bepaalde basen in 5922 gesequencete doelgebieden met 8 PolyC-herhalingen correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,53%)
- Dinucleotide-repeatlengtes  $\leq 31x$  (32233922 van 32233926 bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 31 dinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,21%)
- Trinucleotide-repeatlengtes  $\leq 23x$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 23 trinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,21%)
- Insertielengtes  $\leq 18$  (alle bepaalde basen in 1692 gesequencete doelgebieden met een insertie met 18 werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 7,71%)

- Deletielengtes  $\leq 21$  (alle bepaalde basen in 1692 gesequencete doelgebieden met een deletie van 21 werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 1,14%)

## Somatic (Somatisch)

Het hier beschreven onderzoek werd gebruikt om de nauwkeurigheid te beoordelen van de variantbepaling van de Somatic FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing op de NovaSeq 6000Dx-instrument met behulp van de NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli).

Voor dit onderzoek werd gebruikgemaakt van een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 1.970.505 basen (9.232 doelen) in alle 23 menselijke chromosomen. Platinum Genome DNA werd geëxtraheerd uit met FFPE behandelde blokken om vier unieke monsters te genereren voor evaluatie in het onderzoek.

DNA van monster GM12877 werd verdund met DNA van monster GM12878 om GM12877-13 te creëren met unieke GM12877 heterozygote en homozygote varianten met frequenties in de buurt van respectievelijk 6,5% en 13%. DNA van monster GM12878 werd op dezelfde manier verdund met DNA van monster GM12877 om GM12878-13 te creëren met unieke GM12878-heterozygote en homozygote varianten met frequenties in de buurt van respectievelijk 6,5% en 13%. Ook werden onverdunde GM12877 en GM12878 getest. Elk van de monsters werd getest in replicaten van twaalf, behalve onverdunde GM12878, die in replicaten van elf werd getest. In totaal werden achttien runs uitgevoerd met drie sequencing-instrumenten, drie partijen S4-reagentia en twee operatoren gedurende zes startdagen. De nauwkeurigheid werd bepaald voor SNV's, inserties en deleties door de resultaten te vergelijken met de Platinum Genomes versie 2016-1.0.

Tabel 19 Samenvatting van somatische overeenkomst

Criteria	Aantal waarnemingen <sup>1</sup>	Resultaat van waarnemingen <sup>2</sup>	Resultaat per run <sup>3</sup>
PPA voor somatische SNV's	846	99,8	98,9
PPA voor somatische inserties	846	100	100
PPA voor somatische deleties	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Berekend als = aantal monsters per run (47) x aantal runs (18) = 846.

<sup>2</sup> Laagste waargenomen waarde per monsterreplicaat in alle 18 runs.

<sup>3</sup> Laagste waarde wanneer de gegevens van elke run samen worden geanalyseerd.

[Somatische overeenkomst per monster op pagina 51](#) bevat de onderzoeksgegevens gepresenteerd met positieve en negatieve procentuele overeenkomst per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met de goed gekarakteriseerde samengestelde referentiemethode voor PPA-berekeningen. De drie varianttypen (SNV's, inserties en deleties) worden gecombineerd. Omdat de referentiemethode alleen resultaten oplevert voor de enkelvoudige nucleotide-varianten en inserties/deleties, worden niet-variantebaseresultaten vergeleken met build hg19 van de referentiesequentie van het menselijk genoom voor NPA-berekeningen.

Tabel 20 Somatische overeenkomst per monster

Monster	Autosoom bepaalbaarheid	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877- 13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878- 13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

[Somatische overeenkomst per monster en varianttype op pagina 51](#) bevat de onderzoeksgegevens gepresenteerd per monster, waarbij de variantresultaten worden vergeleken met de goed gekarakteriseerde samengestelde referentiemethode. De detectie werd voor elk varianttype (SNV's, inserties en deleties) afzonderlijk geëvalueerd. Referentieposities zijn uitgesloten.

Tabel 21 Somatische overeenkomst per monster en varianttype

Monster	SNV's			Inserties			Deleties		
	Verwacht	TP	FN	Verwacht	TP	FN	Verwacht	TP	FN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

De vier monsters werden verder geanalyseerd op het bepalen van kleine inserties en deleties (indels). Een algemene samenvatting wordt gegeven in [Samenvatting van somatische indeldetectie op pagina 52](#). Er waren in totaal 210 indels, variërend in grootte van 1-18 bp voor inserties en 1-21 bp voor deleties.

Tabel 22 Samenvatting van somatische indeldetectie

Varianttype	Verwachte varianten	TP	FN	Variant zonder bepalingen	PPA
Insertie	11772	11772	0	0	100
Deletie	10098	9666	0	432	100

De representatieve assay bestond uit 9.232 doelen met een verscheidenheid aan genomische inhoud. De GC-inhoud van de doelen varieerde van 0,20–0,86. Doelen hadden ook een reeks van enkele nucleotide- (bijv. PolyA, PolyT), dinucleotide- en trinucleotideherhalingen. Gegevens die per chromosoom zijn verzameld om het effect van de genomische inhoud op het percentage correcte bepalingen vast te stellen, worden in [Nauwkeurigheid op somatisch-chromosoomniveau op pagina 52](#) weergegeven. Het percentage correcte bepalingen bestaat uit variant- en referentie-bepalingen en is lager dan 100% als er onjuiste of geen bepalingen zijn.

Tabel 23 Nauwkeurigheid op somatisch-chromosoomniveau

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucleotide (22), Trinucleotide (8), Insertie (3), Deletie (0)	[0,22 - 0,8]; Mediaan: 0,51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucleotide (22), Trinucleotide (8), Insertie (5), Deletie (1)	[0,24 - 0,81]; Mediaan: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucleotide (12), Trinucleotide (6), Insertie (1), Deletie (1)	[0,25 - 0,86]; Mediaan: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucleotide (5), Trinucleotide (5), Insertie (0), Deletie (1)	[0,27 - 0,77]; Mediaan: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleotide (10), Trinucleotide (8), Insertie (8), Deletie (18)	[0,29 - 0,79]; Mediaan: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucleotide (18), Trinucleotide (11), Insertie (0), Deletie (1)	[0,24 - 0,79]; Mediaan: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleotide (31), Trinucleotide (5), Insertie (1), Deletie (4)	[0,2 - 0,77]; Mediaan: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (9), Insertie (4), Deletie (0)	[0,26 - 0,78]; Mediaan: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucleotide (9), Trinucleotide (9), Insertie (0), Deletie (1)	[0,27 - 0,83]; Mediaan: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucleotide (16), Trinucleotide (6), Insertie (0), Deletie (0)	[0,23 - 0,78]; Mediaan: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleotide (26), Trinucleotide (7), Insertie (2), Deletie (2)	[0,28 - 0,8]; Mediaan: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8



Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucleotide (7), Trinucleotide (7), Insertie (0), Deletie (3)	[0,26 - 0,77]; Mediaan: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleotide (6), Trinucleotide (8), Insertie (14), Deletie (0)	[0,28 - 0,79]; Mediaan: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucleotide (6), Trinucleotide (6), Insertie (4), Deletie (0)	[0,29 - 0,77]; Mediaan: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucleotide (8), Insertie (4), Deletie (0)	[0,29 - 0,76]; Mediaan: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (10), Insertie (15), Deletie (21)	[0,3 - 0,76]; Mediaan: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucleotide (13), Trinucleotide (6), Insertie (18), Deletie (1)	[0,28 - 0,82]; Mediaan: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucleotide (10), Insertie (0), Deletie (0)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (7), Insertie (2), Deletie (3)	[0,33 - 0,83]; Mediaan: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucleotide (9), Insertie (5), Deletie (0)	[0,31 - 0,84]; Mediaan: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucleotide (5), Insertie (1), Deletie (0)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucleotide (5), Trinucleotide (6), Insertie (6), Deletie (0)	[0,27 - 0,74]; Mediaan: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6

Chromosoom	Aantal genen	Aantal doelen	Aantal basen	Genomische inhoud	GC-bereik	Correcte bepalingen	Onjuiste bepalingen	Niet-bepalingen	% correcte bepalingen	% niet-bepalingen
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucleotide (5), Trinucleotide (23), Insertie (3), Deletie (0)	[0,2 - 0,72]; Mediaan: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertie (0), Deletie (0)	[0,4 - 0,59]; Mediaan: 0,45	0	0	0	N.v.t.	N.v.t.

De sequencing-resultaten voor monster GM12878 werden vergeleken met een genotype met hoge betrouwbaarheid voor NA12878, vastgesteld door het National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Van de 9.232 doelen waren 8.009 doelen volledig aanwezig in de zeer betrouwbare genomgebieden, 776 doelen hadden een gedeeltelijke overlap en 447 doelen hadden geen overlap in de NIST-sequentie. Dit resulteerde in 1.831.483 coördinaten per replicaat ter vergelijking. Niet-variante basebepalingen werden vergeleken met build 19 van het humane referentiegenoom. De nauwkeurigheidresultaten worden getoond in [Somatische overeenkomst van monster GM12878 met NIST-database op pagina 61](#).

Tabel 24 Somatische overeenkomst van monster GM12878 met NIST-database

Monster	Aantal doelen gedekt	Autosoom bepaalbaarheid	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Op basis van de gegevens van dit somatische onderzoek met 18 runs kan de NovaSeq 6000Dx-instrument consequent sequenties bepalen voor:

- GC-inhoud  $\geq 20\%$  (alle bepaalde basen in 1692 gesequencete doelgebieden met 20% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 0,34%)
- GC-inhoud  $\leq 86\%$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 86% GC-inhoud correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 4,21%)
- PolyA-lengtes  $\leq 46$  (14550082 uit 14550083 bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 46 PolyA-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 4,18%)
- PolyT-lengtes  $\leq 40$  (12833489 van 12833491 bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 40 PolyT-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 4,37%)
- PolyG-lengtes  $\leq 11$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 11 PolyG-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 7,59%)
- PolyC-lengtes  $\leq 8$  (9405604 van 9405615 bepaalde basen in 5922 gesequencete doelgebieden met 8 PolyC-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 4,68%)
- Dinucleotide-repeatlengtes  $\leq 31x$  (30996684 van 30996712 bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 31 dinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 4,04%)
- Trinucleotide-repeatlengtes  $\leq 23x$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 23 trinucleotide-repeat werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 5,39%)
- Insertielengtes  $\leq 18$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 18 insertie werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 1,44%)
- Deletielengtes  $\leq 21$  (alle bepaalde basen in 846 gesequencete doelgebieden met 21 deletie werden correct bepaald met een niet-bepalingspercentage van 7,86%)

## Precisie

De precisie van de NovaSeq 6000Dx-instrument werd beoordeeld aan de hand van Platinum Genome-monsters met een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 1.970.505 basen in 23 verschillende chromosomen, met behulp van 9232 doeloligo's. In totaal werden 1723 kleine doelvarianten (SNV's, inserties en deleties) geëvalueerd. Het kiemlijnonderzoek bestond uit elf of twaalf replicaten van vier unieke Platinum Genome-monsters. Somatische tests bestonden uit elf of twaalf replicaten van vier unieke met FFPE behandelde Platinum Genome-monsters op verschillende VAF-niveaus.

Monsterbibliotheken werden geprepareerd met behulp van Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kitreagentia.

Het testen werd uitgevoerd op één interne locatie met behulp van drie NovaSeq 6000Dx-instruments, drie partijen elk van NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli), en twee operators gedurende zes startdagen. Voor elke startdag werden kiemlijnmonsterbibliotheken aan één kant van het instrument gesequencet met behulp van S2-reagentia en de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing, en somatische monsterbibliotheken werden aan de andere kant van het instrument gesequencet met behulp van S4-reagentia en de Somatic FASTQ- en VCF-generatie analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing. Deze tests resulteerden in 18 stroomcellen voor zowel de kiemlijn- als de somatische workflow.

## Kiemlijn

Voor kiemlijnruns worden genomische locaties waar een doelkiemlijnvariant is ontdekt, gerapporteerd als een positieve (variant). Voor de verwachte positieve kiemlijnvarianten werden de gegevens geëvalueerd voor het percentage niet-bepalingen en het percentage positieve bepalingen (PPC) binnen elk varianttype (SNV, insertie, deletie). [Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte positieve resultaten per varianttype op pagina 63](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode voor elk varianttype.

Tabel 25 Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte positieve resultaten per varianttype

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen positieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PPC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insertie	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Deletie	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Positieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij een variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Genomische locaties waarbij een doelvariant niet is gedetecteerd, worden als negatief (wild-type) gerapporteerd. Voor verwachte negatieve locaties werden de gegevens geëvalueerd voor de percentages van niet-bepalingen en het percentage negatieve bepalingen (PNC). [Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van kiemlijnbepaling voor verwachte negatieve resultaten op pagina 64](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode.

Tabel 26 Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van kiemlijnbepaling voor verwachte negatieve resultaten

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen negatieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PNC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
Wild-type	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Negatieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij geen variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

De bijdrage van elke parameter (instrument, reagenspartij, dag, bibliotheekreplicaat) aan de totale variabiliteit werd bepaald middels variantiecomponentanalyse met de variantfrequentie als de responsvariabele. De totale standaarddeviatie had een gemiddelde van 0,0370. De grootste bijdrage aan de variabiliteit van de variantfrequentie kwam van de bibliotheekreplicaten, die tot 17,1% van de totale variabiliteit bijdroegen. De dag droeg bij aan 1%, terwijl instrument en reagenspartij elk bijdroegen aan minder dan 1% van de totale variabiliteit [Intralaboratoriumprecisie bij schattingen van variantiecomponenten voor variantfrequenties van kiemlijnmonsters op pagina 64](#) (SD = standaarddeviatie).

Tabel 27 Intralaboratoriumprecisie bij schattingen van variantiecomponenten voor variantfrequenties van kiemlijnmonsters

Onderdeel	Gemiddelde SD	Gemiddeld % van totale SD
Dag	0,0020	1,028
Instrument	0,0018	0,837
Verbruiksartikelen	0,0016	0,712
Bibliotheekreplicaat	0,0143	17.110
Totaal	0,0370	100

## Somatic (Somatisch)

Voor somatische runs worden genomische locaties waarop een somatische doelvariant is ontdekt, gerapporteerd als een positieve (variant). Voor verdunde monsters GM12877-13 en GM12878-13 met verwachte positieve somatische varianten bij VAF's tussen 6,5% en 13% werden de gegevens geëvalueerd voor het percentage niet-bepalingen en percentage positieve bepalingen (PPC) binnen elk varianttype (SNV, insertie, deletie). [Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte](#)



[positieve resultaten per varianttype \(gemiddelde VAF is  \$\geq 6,5\%\$  en  \$\leq 13\%\$ \) op pagina 65](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode voor elk varianttype.

Tabel 28 Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte positieve resultaten per varianttype (gemiddelde VAF is  $\geq 6,5\%$  en  $\leq 13\%$ )

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen positieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PPC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insertie	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Deletie	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Positieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij een variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Genomische locaties waarbij een somatische doelvariant niet is gedetecteerd, worden als negatief (wild-type) gerapporteerd. Voor verwachte negatieve locaties werden de gegevens geëvalueerd op de percentages van niet-bepalingen en het percentage negatieve bepalingen. [Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte negatieve resultaten op pagina 65](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode.

Tabel 29 Intralaboratoriumprecisie bij waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte negatieve resultaten

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen negatieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PNC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
Wild-type	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Negatieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij geen variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

De bijdrage van elke parameter (instrument, reagenspartij, dag, bibliotheekreplicaat) aan de totale variabiliteit werd bepaald middels variantiecomponentanalyse met de variantfrequentie als de responsvariabele. De totale standaarddeviatie had een gemiddelde van 0,0062. Bibliotheekpreparaatreplicaten bleven de belangrijkste bron van variabiliteit, goed voor 50,7% van het totaal. Dag, instrument en verbruiksartikelpartij droegen elk bij aan minder dan 1% van de totale variabiliteit [Intralaboratoriumprecisie bij schattingen van variantiecomponenten voor variantfrequenties van somatische monsters op pagina 66](#) (SD = standaarddeviatie).

Tabel 30 Intralaboratoriumprecisie bij schattingen van variantiecomponenten voor variantfrequenties van somatische monsters

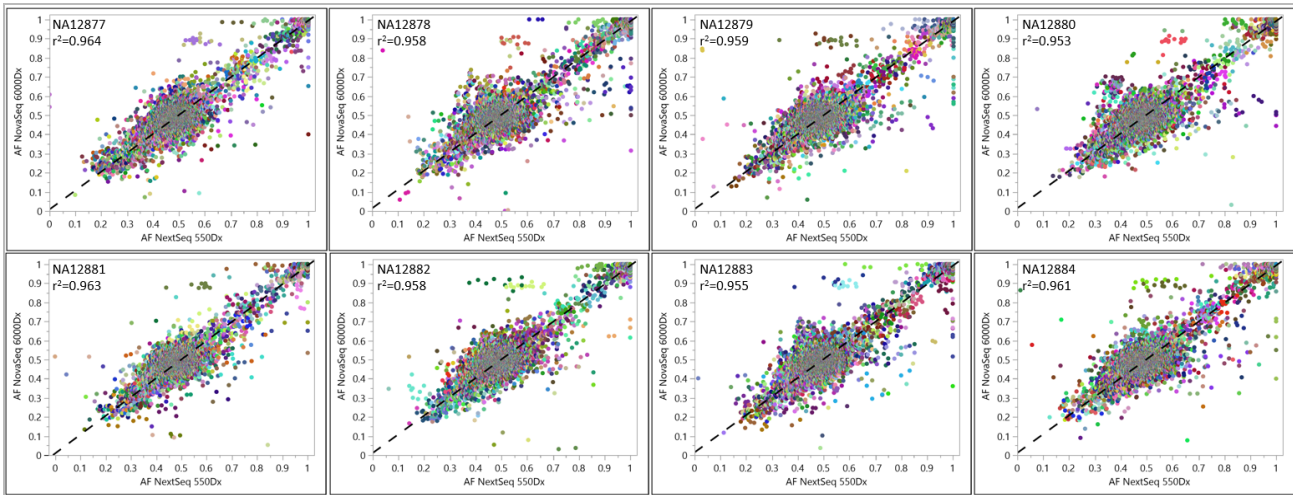
Onderdeel	Gemiddelde SD	Gemiddeld % van totale SD
Dag	0,0002	0,41
Instrument	0,0002	0,40
Verbruiksartikelen	0,0002	0,35
Bibliotheekreplicaat	0.0044	50,7
Totaal	0,0062	100

## Methodevergelijking

Er werd een onderzoek uitgevoerd om de prestaties te vergelijken tussen de NovaSeq 6000Dx- en NextSeq 550Dx-instrumenten. De overeenkomst van de variantfrequentie voor bloedmonsters werd geëvalueerd met behulp van een representatieve assay die is ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken die 1.970.505 basen op alle 23 menselijke chromosomen bestrijken. Er werden acht Platinum Genome DNA-monsters getest, zeven in replicaten van zes en één (NA12881) in replicaten van vijf. De bibliotheken werden gesequencet op de NovaSeq 6000Dx-instrument met behulp van de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing en op het NextSeq 550Dx-instrument met behulp van de DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager-module.

*Correlatiediagrammen voor variantfrequentie (Punten zijn gekleurd per unieke variant. Varianten kunnen in elk diagram anders gekleurd zijn.) op pagina 67* brengen voor elk monster de VAF-correlatie tussen de twee instrumenten in kaart. Op basis van de sterke correlatie tussen het NovaSeq 6000Dx-instrument- en het NextSeq 550Dx-instrument wordt bepaald dat prestatiekenmerken die verband houden met pre-analytische factoren (bijvoorbeeld extractiemethoden of interfererende stoffen) voor beide instrumenten van toepassing zijn. Zie de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-bijsluiters voor meer informatie.

Afbeelding 15 Correlatiediagrammen voor variantfrequentie (Punten zijn gekleurd per unieke variant. Varianten kunnen in elk diagram anders gekleurd zijn.)



## Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid van de NovaSeq 6000Dx-instrument werd beoordeeld aan de hand van Platinum Genome-monsters met een representatieve assay die was ontworpen om een verscheidenheid aan genen te onderzoeken, met 1.970.505 basen in 23 verschillende chromosomen, met behulp van 9232 doeloligo's. In totaal werden 1723 kleine doelvarianten (SNV's, inserties en deleties) geëvalueerd. Het kiemlijnonderzoek bestond uit drie of vier replicaten van twaalf unieke Platinum Genome-monsters. Somatische tests bestonden uit vijf of zes replicaten van acht unieke met FFPE behandelde Platinum Genome-monsters op verschillende VAF-niveaus. Monsterbibliotheken werden geprepareerd met behulp van Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kitreagentia.

De tests werden uitgevoerd op drie externe locaties met elk één partij van NovaSeq 6000Dx S2-reagent v1.5 kit (300 cycli) en NovaSeq 6000Dx S4 reagens v1.5 kit (300 cycli). Op elke locatie werd één NovaSeq 6000Dx-instrument gebruikt. Op elke locatie voerden twee operators de tests uit. Elke operator voerde op drie niet opeenvolgende startdagen tests uit voor elk type monster, voor in totaal 36 stroomcellen op de drie locaties. Voor elke startdag werden kiemlijnmonsterbibliotheken gesequencet aan instrumentzijde A met behulp van S2-reagentia en de Germline FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing, en somatische monsterbibliotheken werden gesequencet aan instrumentzijde B met behulp van S4-reagentia en de Somatic FASTQ- en VCF-generatie-analyseworkflow van de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-toepassing. Deze tests resulteerden in 18 stroomcellen voor zowel de kiemlijn- als de somatische workflow.

## Kiemlijn

Voor kiemlijnruns worden genomische locaties waar een doelkiemlijnvariant is ontdekt, gerapporteerd als een positieve (variant). Voor de verwachte positieve kiemlijnvarianten werden de gegevens geëvalueerd voor het percentage niet-bepalingen en het percentage positieve bepalingen (PPC) binnen elk varianttype (SNV,

insertie, deletie). [Waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte positieve resultaten per varianttype op pagina 68](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode voor elk varianttype.

Tabel 31 Waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte positieve resultaten per varianttype

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen positieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PPC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insertie	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Deletie	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Positieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij een variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Genomische locaties waarbij een doelvariant niet is gedetecteerd, worden als negatief (wild-type) gerapporteerd. Voor verwachte negatieve locaties werden de gegevens geëvalueerd voor de percentages van niet-bepalingen en het percentage negatieve bepalingen (PNC). [Waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte negatieve resultaten op pagina 68](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode.

Tabel 32 Waarnemingen van kiemlijnbeplating voor verwachte negatieve resultaten

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen negatieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PNC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
Wild-type	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Negatieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij geen variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

## Somatic (Somatisch)

Voor somatische runs worden genomische locaties waarop een somatische doelvariant is ontdekt, gerapporteerd als een positieve (variant). Voor verwachte positieve somatische varianten waarbij de gemiddelde variantallelfrequentie (VAF) groter is dan of gelijk aan 14% en kleiner dan of gelijk aan 28%, werden de gegevens geëvalueerd voor het percentage niet-bepalingen en het percentage positieve bepalingen (PPC) binnen elk varianttype (SNV, insertie, deletie). [Waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte positieve resultaten per varianttype \(gemiddelde VAF is  \$\geq 14\%\$  en  \$\leq 28\%\$ \) op pagina 69](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode voor elk varianttype.

Tabel 33 Waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte positieve resultaten per varianttype (gemiddelde VAF is  $\geq 14\%$  en  $\leq 28\%$ )

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen positieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PPC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insertie	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Deletie	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Positieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij een variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

Genomische locaties waarbij een somatische doelvariant niet is gedetecteerd, worden als negatief (wild-type) gerapporteerd. Voor verwachte negatieve locaties werden de gegevens geëvalueerd op de percentages van niet-bepalingen en het percentage negatieve bepalingen. [Waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte negatieve resultaten op pagina 69](#) geeft een overzicht van de waargenomen percentages, samen met de onderste en bovenste 95%-betrouwbaarheidsniveaus (LCL/UCL), berekend met behulp van de Wilson-scoremethode voor elk varianttype.

Tabel 34 Waarnemingen van somatische bepaling voor verwachte negatieve resultaten

Varianttype	Geen bepalingen waargenomen <sup>1</sup>	Totaal aantal bepalingen	Percentage niet-bepalingen	Waargenomen negatieve bepalingen <sup>2</sup>	Totaal aantal evalueerbare bepalingen	PNC	95% LCL <sup>3</sup>	95% UCL
Wild-type	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

<sup>1</sup> Niet-bepaling gedefinieerd als chromosomale doelpositie waarbij geen variant kan worden bepaald (vanwege lage dekkingsdiepte).

<sup>2</sup> Negatieve bepaling gedefinieerd als chromosomale doelposities waarbij geen variant is gedetecteerd.

<sup>3</sup> Tweezijdig 95%-betrouwbaarheidsinterval berekend aan de hand van de Wilson-scoremethode.

## Revisiegeschiedenis

Document	Datum	Omschrijving van wijziging
Documentnr. 200025276 v01	September 2022	Precisiegegevens voor waarnemingen van kiemlijnbepaling bijgewerkt.
Documentnr. 200025276 v00	Augustus 2022	Eerste uitgave.

## Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina') en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van het/de hierin beschreven product(en) en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd. Illumina verleent met dit document geen licenties onder zijn octrooi-, handelsmerk-, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van het/de hierin beschreven product(en) te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijk(e) product(en) worden gebruikt.

HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET/DE PRODUCT(EN).

ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).

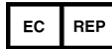
© 2022 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of van hun respectievelijke eigenaren. Ga naar [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html) voor meer informatie over specifieke handelsmerken.

## Contactgegevens



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Californië 92122 VS  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Australische sponsor

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

## Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die op de verpakkingen en labels van de producten staan, de symbolenlijst voor uw kit op [support.illumina.com](http://support.illumina.com) op het tabblad *Documentation* (Documentatie).