

Packungsbeilage

ZUR VERWENDUNG FÜR DIE IN-VITRO-DIAGNOSE
NUR ZUM EXPORT

Verwendungszweck

Der NovaSeq 6000Dx Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken mit *In-vitro*-Diagnose(IVD)-Assays vorgesehen. Das NovaSeq 6000Dx Gerät ist für den Gebrauch mit bestimmten registrierten, zertifizierten oder genehmigten IVD-Reagenzien und Analysesoftware vorgesehen.

Verfahrensprinzipien

Der Illumina® NovaSeq 6000Dx Gerät ist für die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken mit *In-vitro*-Diagnose-Assays vorgesehen. Für die Zugabe nutzt das NovaSeq 6000Dx aus DNA generierte Bibliotheken, bei denen amplifizierten Targets Probenindizes und Erfassungssequenzen hinzugefügt werden. Die Probenbibliotheken werden auf einer Fließzelle erfasst und auf dem Gerät unter Verwendung von SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis [Sequenzierung durch Synthese]) sequenziert. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Die Software Real-Time Analysis (RTA) (Echtzeitanalyse) führt die Bildanalyse sowie das Base-Calling durch und weist jeder Base für jeden Sequenzierungszyklus einen Qualitäts-Score zu. Nach Abschluss der Primäranalyse kann die Sekundäranalyse auf dem Illumina DRAGEN-Server für NovaSeq 6000Dx ausgeführt werden, um Base-Calls zu verarbeiten. Der NovaSeq 6000Dx verwendet je nach Arbeitsablauf unterschiedliche Module für die Sekundäranalyse-Anwendung. Für die Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx umfasst die Verarbeitung das Demultiplexing, Erzeugen von FASTQ-Dateien, Alignment, Varianten-Calling sowie das Erzeugen von Dateien im Varianten-Call-Format (VCF und gVCF). In den VCF- und gVCF-Dateien sind Informationen über Keimbahn- oder somatische Varianten (je nach ausgewähltem Arbeitsablauf) enthalten, die an bestimmten Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

Zwei Betriebsmodi

Der NovaSeq 6000Dx enthält eine Single-Boot-Festplatte mit separaten *In-vitro*-Diagnose-(IVD) und Research Use Only(RUO)-Modi. Der Modus wird mit der Umschaltung auf den Bildschirmen „Sequencing“ (Sequenzierung) ausgewählt. Der ausgewählte Modus wird in der Benutzeroberfläche auf allen Bildschirmen deutlich angezeigt. IVD-Sequenzierungsassays, einschließlich der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx in Keimbahn- und/oder somatischen Arbeitsabläufen, werden im IVD-Modus ausgeführt. Im IVD-Modus können nur IVD-Sequenzierungsreagenzien benutzt werden. Leistungsmerkmale und Einschränkungen des Verfahrens für den NovaSeq 6000Dx wurden mit der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bestimmt.

Einschränkungen des Verfahrens

1. Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.
2. Die Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kann bei Benutzung mit dem NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und dem NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) Folgendes bereitstellen:
 - Sequenzierungsausgabe:
 - $\geq 1,0$ Terabasen (TB) mit dem S2-Kit
 - $\geq 3,0$ TB mit dem S4-Kit
 - Read-Länge (bei Paired-End-Läufen) von 2 x 150 Basenpaaren (bp).
 - Basen höher als Q30 ≥ 85 % bei einer Read-Länge von 2 x 150 bp. Gleich oder mehr als 85 % der Base-Calls haben Qualitäts-Scores auf der Phred-Skala von mehr als 30, was auf eine Base-Call-Genauigkeit von mehr als 99,9 % hinweist.
3. Insertionen der Länge > 18 bp und Deletionen der Länge > 21 bp wurden nicht überprüft.
4. Große Varianten wie Mehrfachnukleotidvarianten (MNV) und große Indels werden in der VCF-Ausgabedatei möglicherweise als separate kleinere Varianten aufgeführt.
5. Kleine MNV werden als separate Varianten in der VCF-Ausgabedatei aufgeführt.
6. Deletionen werden in der VCF-Datei an der Koordinate der vorhergehenden Base gemäß VCF-Format aufgeführt. Daher müssen benachbarte Varianten in Betracht gezogen werden, bevor ein individueller Base-Call als homozygote Referenz aufgeführt wird.
7. Keimbahn-spezifische Einschränkungen:
 - Das NovaSeq 6000Dx mit dem Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ist darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von Keimbahnvarianten (z. B. homozygot, heterozygot, Wildtyp) zu liefern.
 - Kopienzahlvarianten haben einen Einfluss darauf, ob eine Variante als homozygot oder heterozygot identifiziert wird.
 - Das System führt nicht mehr als zwei Varianten an einer einzigen Position auf, selbst bei Vorhandensein einer Kopienzahlvariation.
8. Spezifische Einschränkungen für somatische Varianten:
 - Das NovaSeq 6000Dx mit dem Somatic FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ist darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von somatischen Varianten (Vorhandensein einer somatischen Variante) zu liefern.
 - Der Arbeitsablauf zur Generierungsanalyse von Somatic FASTQ und VCF kann nicht zwischen Keimbahn- und somatischen Varianten unterscheiden. Der Arbeitsablauf ist darauf ausgelegt, Varianten über einen Bereich von Variantenhäufigkeiten hinweg zu erkennen. Jedoch können mit der Variantenhäufigkeit nicht die somatischen Varianten von Keimbahn-Varianten unterschieden werden.

- Normales Gewebe in der Probe beeinträchtigt den Nachweis von Varianten. Die gemeldete Nachweisgrenze basiert auf einer Variantenhäufigkeit bezogen auf die Gesamt-DNA, die aus dem Tumor und normalem Gewebe extrahiert wurde.
- Bei einem Call von mehr als einem Varianten-Allel am selben Locus wird keines der Allele als erfolgreiche Variante gemeldet. Stattdessen wird der vollständige Satz von Allelen aufgeführt, aber über das multiallelische Tag gefiltert.

Verfahren zur Qualitätskontrolle

Die Software NovaSeq 6000Dx beurteilt jeden Lauf, jede Probe und jeden Base-Call anhand von Qualitätskontrollmetriken. Es wird empfohlen, positive und negative Kontrollproben in die Bibliotheksvorbereitung einzubeziehen und zu beurteilen. Beurteilen Sie die Kontrollproben wie folgt:

- Negative Kontrollprobe (keine Matrizenkontrolle) oder andere Negativkontrolle: Muss das erwartete Ergebnis generieren. Wenn die negative Kontrollprobe ein anderes als das erwartete Ergebnis generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten oder es hat eine Kontamination stattgefunden.
- Positive Kontrollprobe: Muss das erwartete Ergebnis generieren. Wenn die positive Kontrollprobe ein anderes als das erwartete Ergebnis generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten.

Produktkomponenten

Der Illumina NovaSeq 6000Dx besteht aus:

1. NovaSeq 6000Dx Gerät (Katalog-Nr. 20068232)
2. Zu den Softwarekomponenten für das NovaSeq 6000Dx Gerät gehören:

Softwareanwendung	Installationsort	Funktion	Beschreibung
NovaSeq Operating Software (Betriebssystemsoftware)	NovaSeq 6000Dx	Steuert den Betrieb des Geräts.	Die NovaSeq Operating Software (Betriebssystemsoftware) (NVOS) steuert den Betrieb des Geräts während der Sequenzierung und erzeugt Bilder, die anschließend von der Software „Real-Time Analysis“ (RTA) (Echtzeitanalyse) benutzt werden.

Softwareanwendung	Installationsort	Funktion	Beschreibung
Real-Time Analysis Software (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Führt die Primäranalyse durch.	Die RTA-Softwareanwendung konvertiert die von NVOS für jede Platte pro Zyklus des Sequenzierungslaufs erzeugten Bilder in Base-Call-Dateien. Die Base-Call-Dateien sind Eingaben für die Anwendungsmodulare auf dem Illumina DRAGEN-Server für NovaSeq 6000Dx. Die RTA-Softwareanwendung verfügt nicht über eine Benutzeroberfläche.
Lokaler Laufmanager	Illumina DRAGEN-Server	Steuert die Laufeinrichtung und -verwaltung.	Der Lokaler Laufmanager ermöglicht die Benutzer- und Geräteverwaltung, hostet die Anwendungssoftware und ermöglicht die Verwendung von Hardware-beschleunigten Genomik-Sekundäranalysenmodulen von DRAGEN.

Betriebsbedingungen

Weitere Informationen zu den Betriebsbedingungen finden Sie im *NovaSeq 6000Dx Produktdokumentation zum Gerät* im Abschnitt „Umgebungsanforderungen“.

Umgebungsfaktor	Spezifikation
Temperatur	Die Labortemperatur muss 19 bis 25 °C (22 °C ±3 °C) betragen. Diese Temperatur ist der Betriebstemperaturbereich des Geräts. Die Umgebungstemperatur darf während eines Laufs nicht um mehr als ±2 °C abweichen.
Luftfeuchtigkeit	Es muss eine relative, nicht kondensierende Luftfeuchtigkeit zwischen 20 und 80 % aufrechterhalten werden. Das System sollte in einer Betriebshöhe von 2.000 Metern oder niedriger betrieben werden.

Verbrauchsmaterialien und Ausstattung

In diesem Abschnitt ist alles aufgeführt, was für einen Sequenzierungslauf mit NovaSeq 6000Dx benötigt wird. Dazu gehören von Illumina bereitgestellte Verbrauchsmaterialien und zusätzliche Verbrauchsmaterialien und Geräte, die Sie bei anderen Lieferanten kaufen müssen. Diese Artikel sind erforderlich, um das Protokoll zu vervollständigen und Wartungs- und Fehlerbehebungsverfahren durchzuführen.

Weitere Informationen zu den Symbolen auf Verbrauchsmaterialien oder Verpackungen von Verbrauchsmaterialien finden Sie im [Illumina IVD Symbol Key \(IVD-Symbolschlüssel\) \(Dokument-Nr. 1000000039141\)](#).

Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

Für einen Lauf mit NovaSeq 6000Dx sind diese Komponenten erforderlich:

- Pufferkartusche
- Clusterkartusche
- Fließzelle
- Bibliotheksröhrchen
- SBS-Kartusche

Die Verbrauchsmaterialien für NovaSeq 6000Dx sind in diesen Konfigurationen verpackt. Für jede Komponente wird RFID (Radio Frequency Identification [Identifizierung mithilfe elektromagnetischer Wellen]) für die genaue Nachverfolgung von Verbrauchsmaterialien und Kompatibilität verwendet.

Tabelle 1 Von Illumina bereitgestellte Verbrauchsmaterialien

Name des Kits	Inhalt	Illumina Katalognummer
NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen)	S2-Clusterkartusche S2-Fließzelle S2-SBS-Kartusche	20046931
NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen)	S4-Clusterkartusche S4-Fließzelle S4-SBS-Kartusche	20046933
NovaSeq 6000Dx-S2-Pufferkartusche	S2-Pufferkartusche	20062292
NovaSeq 6000Dx-S4-Pufferkartusche	S4-Pufferkartusche	20062293
NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen	Ein Bibliotheksröhrchen	20062290
NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen, Packung mit 24 Stück	24 Bibliotheksröhrchen	20062291

Lagern Sie die Komponenten nach Erhalt der Verbrauchsmaterialien bei der angegebenen Temperatur, um eine ordnungsgemäße Leistung sicherzustellen.

Tabelle 2 Lagerung des NovaSeq 6000Dx-Kits

Verbrauchsmaterial	Menge	Lagerungstemperatur	Länge	Breite	Höhe
Fließzelle	1	2–8 °C	27,7 cm	17 cm	3,8 cm
Clusterkartusche	1	-25 bis -15 °C	29,5 cm	13 cm	9,4 cm
SBS-Kartusche	1	-25 bis -15 °C	30 cm	12,4 cm	11,2 cm
Pufferkartusche	1	15–30 °C	42,2 cm	20,6 cm	21,1 cm
Bibliotheksröhrchen	1	15–30 °C	4,1 cm	2,3 cm	12,4 cm

Einzelheiten zu Verbrauchsmaterialien

Zur Bestimmung kompatibler Kit-Komponenten sind Fließzellen und Kartuschen mit Symbolen gekennzeichnet, die den Kit-Modus angeben.

Tabelle 3 Kennzeichnung für Kompatibilität

Kit-Modus	Markierung auf Etikett	Beschreibung
S2-Kit-Komponenten		S2-Fließzellen generieren bis zu 4,1 Milliarden Single-Reads nach Filterung mit einer Ausgabe von bis zu 1.000 Gb bei 2 x 150 bp. Die S2-Fließzelle bietet eine schnelle Sequenzierung für die meisten Anwendungen mit hohem Durchsatz.
S4-Kit-Komponenten		S4-Fließzellen generieren bis zu 10 Milliarden Single-Reads nach Filterung mit einer Ausgabe von bis zu 3.000 Gb bei 2 x 150 bp. Die S4-Fließzelle ist eine Fließzellenversion mit vier Lanes für eine maximale Ausgabe.

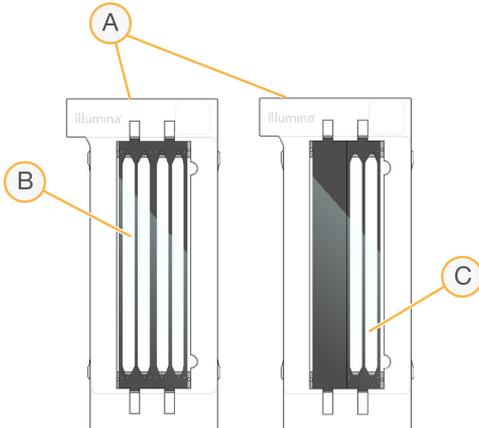
Fließzelle

Die NovaSeq 6000Dx-Fließzelle ist eine strukturierte Fließzelle in einer Kartusche. Die Fließzelle ist ein Glasträger mit Milliarden von Nanowells in einer geordneten Struktur. In den Nanowells werden Cluster gebildet, aus denen dann die Sequenzierung durchgeführt wird.

Jede Fließzelle verfügt über mehrere Lanes zum Sequenzieren gepoolter Bibliotheken. Die S2-Fließzelle verfügt über je zwei Lanes, die S4-Fließzelle über vier. Jede Lane wird auf mehreren Bildstreifen abgebildet. Anschließend teilt die Software das Bild jedes Bildstreifens in kleinere Teile. Diese werden als Platten bezeichnet.

Einige Kratzer und andere kleinere kosmetische Mängel auf der Fließzelle sind normal und lassen keine Beeinträchtigung der Datenqualität erwarten. Illumina empfiehlt die normale Verwendung dieser Fließzellen.

Abbildung 1 Fließzellen



- A. Fließzellenkartusche
- B. Fließzelle mit vier Lanes (S4)
- C. Fließzelle mit zwei Lanes (S2)

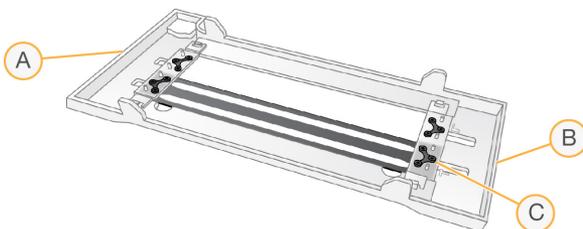
An der Unterseite der einzelnen Fließzellen befinden sich mehrere Dichtungen. Bibliotheken und Reagenzien gelangen durch die Dichtungen an der Einlassseite der Fließzelle in die Lanes der Fließzellen. Benutzte Reagenzien werden durch die Dichtungen an der Auslassseite aus den Lanes entsorgt.



VORSICHT

Berühren Sie die Dichtungen beim Umgang mit der Fließzelle nicht.

Abbildung 2 Invertierte Fließzelle



- A. Auslassseite
- B. Einlassseite
- C. Dichtung (eine von vier)

Einzelheiten zu Puffer-, Cluster- und SBS-Kartuschen

Die Puffer-, -Cluster- und SBS-Kartuschen des NovaSeq 6000Dx verfügen über Behälter mit Verschlussfolie, die mit Reagenzien, Puffern und Waschlösung vorgefüllt sind. Cluster- und SBS-Kartuschen sind in NovaSeq 6000Dx-Reagenzienkits enthalten. Die Pufferkartusche ist separat erhältlich.

Die Kartuschen werden direkt in das Gerät geladen. Sie verfügen über Farbcodierungen und Etiketten, damit Fehler beim Laden reduziert werden können. Führungen in der Reagenzienkühlerschublade und in der Pufferschublade stellen die ordnungsgemäße Ausrichtung sicher.

Tabelle 4 NovaSeq 6000Dx-Kartuschen

Verbrauchsmaterial	Beschreibung
 <p>Pufferkartusche</p>	<p>Vorgefüllt mit Sequenzierungspuffern (wiegt bis zu 6,8 kg). Ein Kunststoffgriff erleichtert das Tragen, Laden und Entladen.</p> <p>Die Pufferkartusche enthält lichtempfindliche Reagenzien. Bewahren Sie den Pufferbehälter bis zum Gebrauch verpackt auf.</p>
 <p>Clusterkartusche</p>	<p>Vorgefüllt mit Clusterbildungs-, Indizierungs- und Paired-End-Reagenzien sowie einer Waschlösung. Verfügt über eine gekennzeichnete Position für das Bibliotheksröhrchen. Die orangefarbene Kennzeichnung unterscheidet die Clusterkartusche von der SBS-Kartusche.</p> <p>Ein denaturiertes Reagenz an Position 30 enthält Formamid, ein organisches Amid und fortpflanzungsgefährdendes Toxin. Für eine leichtere sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien nach dem Sequenzierungslauf ist dieser Behälter herausnehmbar.</p>
 <p>SBS-Kartusche</p>	<p>Vorgefüllt mit Sequenzierungsreagenzien mit Volumina, die der Anzahl an Zyklen entsprechen, die vom Kit unterstützt wird. Jede der drei Reagenzienpositionen verfügt über eine benachbarte Position, die für die automatische Nachwaschung reserviert ist. Die graue Kennzeichnung unterscheidet die SBS-Kartusche von der Clusterkartusche.</p> <p>Die SBS-Kartusche enthält lichtempfindliche Reagenzien. Bewahren Sie den SBS-Behälter bis zum Gebrauch verpackt auf.</p>

Reservierte Clusterkartuschenbehälter

Drei Behälter sind für anwendungsspezifische Primer und eine leere Position ist für das Bibliotheksröhrchen reserviert. Zur Verfolgung der Proben wird das Bibliotheksröhrchen während der Laufkonfiguration in die Clusterkartusche geladen. Dort verbleibt die Kartusche bis zum Ende des Laufs.

Abbildung 3 Nummerierte Behälter

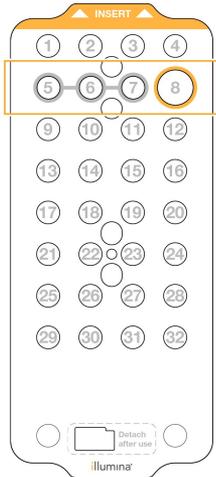


Tabelle 5 Behälter für Clusterkartuschen

Position	Vorbehalten für
5, 6 und 7	Optionale anwendungsspezifische Primer
8	Bibliotheksröhrchen

Vom Benutzer bereitgestellte Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Lieferant	Zweck
500-ml-Zentrifugenflasche	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Tween 20 für einen Wartungswaschlauf.
30-ml-Zentrifugenröhrchen	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von NaOCl für einen Wartungswaschlauf.
Einweg-Handschuhe, ungedudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung.

Verbrauchsmaterial	Lieferant	Zweck
Isopropylalkoholtücher, 70 % oder Ethanolalkoholtupfer, 70 %	VWR, Katalog- Nr. 95041-714 (oder vergleichbar) Allgemeiner Laborlieferant	Säubern von Komponenten vor einem Lauf und allgemeine Verwendung.
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalog- Nr. 21905-026 (oder vergleichbar)	Trocknen des Fließzellentisches und allgemeine Verwendung.
Analysenreine NaOCl- Lösung, 5%ig	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305	Durchführen eines Wartungswaschlaufs.
2-µl-Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	Pipettieren zum Verdünnen und Laden von Bibliotheken.
20-µl-Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	Pipettieren zum Verdünnen und Laden von Bibliotheken.
200-µl-Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	Pipettieren zum Verdünnen und Laden von Bibliotheken.
1.000-µl- Pipettenspitzen	Allgemeiner Laborlieferant	Pipettieren zum Verdünnen und Laden von Bibliotheken.
Isopropylalkohol (99 %) für Reagenzien oder Spektrophotometrie, 100-ml-Flasche	Allgemeiner Laborlieferant	Reinigen von Optikkomponenten in regelmäßigen Abständen und Unterstützen der Objektivreinigungskartusche.
Tween 20	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Durchführen eines Wartungswaschlaufs.
Wasser, Laborqualität	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Tween 20 und Natriumhypochlorit für einen Wartungswaschlauf.

Tabelle 7 Ausrüstung

Artikel	Quelle
Gefrierschrank, -25 bis -15 °C	Allgemeiner Laborlieferant
500-ml-Messzylinder, steril	Allgemeiner Laborlieferant
Eiskübel	Allgemeiner Laborlieferant
20-µl-Pipette	Allgemeiner Laborlieferant
200-µl-Pipette	Allgemeiner Laborlieferant
1.000-µl-Pipette	Allgemeiner Laborlieferant

Artikel	Quelle
Kühlschrank, 2–8 °C	Allgemeiner Laborlieferant
Wanne, Wasserbäder*	Allgemeiner Laborlieferant

* Verwenden Sie eine Wanne, die zwei Reagenzienkartuschen und die erforderliche Wassermenge fassen kann. Beispiel: 61 x 91,4 x 25,4 cm.

Richtlinien für Wasser in Laborqualität

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

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

Gebrauchsanweisung

Die folgenden Anweisungen beziehen sich auf den Betrieb des NovaSeq 6000Dx Gerät im IVD-Betriebsmodus unter Verwendung der S2- oder S4-Kit-Konfigurationen.

Erstellen eines Sequenzierungslaufs

Befolgen Sie diese Schritte zum Erstellen eines Laufs mit Lokaler Laufmanager im IVD- oder RUO-Modus. Alternativ können Sie auf der Seite „Runs“ (Läufe) unter der Registerkarte „Planned“ (Geplant) die Option „**Import Run**“ (Importieren eines Laufs) auswählen und ein Probenblatt importieren. Erstellen Sie neue Läufe entweder auf dem Gerät oder durch Zugriff auf den Lokaler Laufmanager über einen Browser auf einem Computer im Netzwerk.

HINWEIS Die genauen Informationen, die von jeder Analyseanwendung benötigt werden, unterscheiden sich, aber der Prozess zum Erstellen eines Laufs umfasst diese Schritte.

1. Wählen Sie im Bildschirm „Runs“ (Läufe) unter der Registerkarte „Planned“ (Geplant) die Option „**Create Run**“ (Erstellen eines Laufs).
2. Wählen Sie eine Anwendung und dann „**Next**“ (Weiter) aus.
3. Fahren Sie mit den Einstellungsbildschirmen fort. Je nach Anwendung können die angezeigten Bildschirme Folgendes umfassen:

- **Run Settings** (Laufeinstellungen): Geben Sie Laufparameter ein.
 - **Sample Data** (Probendaten): Geben Sie Probendaten manuell ein oder importieren Sie eine CSV-Datei mit Informationen zu den Proben. Probenamen müssen eindeutig sein.
 - **Analysis settings** (Analyseeinstellungen): Geben Sie die Einstellungen für die Analyse ein.
4. Überprüfen Sie auf dem Bildschirm „Review“ (Überprüfen) die Informationen zum Lauf und wählen Sie „Save“ (Speichern) aus.
Der Lauf wird in der Registerkarte „Planned“ (Geplant) oben in der Laufliste hinzugefügt.

Vorbereiten der Verbrauchsmaterialien

Auftauen von SBS- und Clusterkartuschen

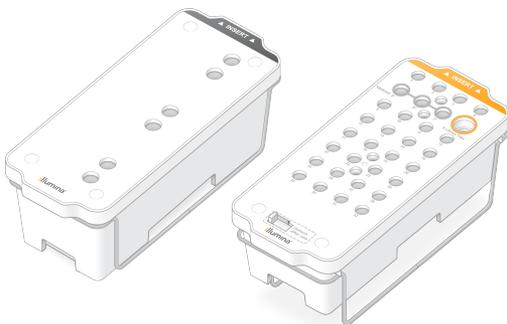


VORSICHT

Wenn Reagenzien mit heißem Wasser aufgetaut werden, kann dies die Datenqualität beeinträchtigen und dazu führen, dass ein Lauf fehlschlägt.

1. Wenn ein Sequenzierunslauf durchgeführt wird, stellen Sie sicher, dass beide Seiten des Geräts verfügbar sind, wenn die Kartuschen aufgetaut sind.
2. Nehmen Sie die SBS- und Cluster-Kartuschen aus dem -25 bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
3. Setzen Sie die einzelnen Kartuschen jeweils in ein Drahtauftau-Rack.
Die Racks sind im Lieferumfang des Geräts enthalten und verhindern, dass die Kartuschen im Wasserbad umkippen.

Abbildung 4 Kartuschen in Drahtauftau-Racks



4. Die Auftauzeit können Sie anhand der folgenden Tabelle bestimmen.

Tauen Sie SBS- und Clusterkartuschen in einem Wasserbad mit Raumtemperatur (19–25 °C) so auf:
Tauchen Sie die Kartuschen etwa bis zur Hälfte ein.

Kartusche	Auftauzeit
S2-SBS-Kartusche	4 Stunden
S2-Clusterkartusche	Bis zu 2 Stunden
S4-SBS-Kartusche	4 Stunden
S4-Clusterkartusche	Bis zu 4 Stunden



VORSICHT

Wenn die Sequenzierung nicht innerhalb von vier Stunden nach dem Auftauen der Reagenzienkartuschen gestartet wird, kann dies die Datenqualität beeinträchtigen.

5. Trocknen Sie die Unterseiten der Kartuschen mit Papierhandtüchern gründlich ab. Trocknen Sie die Well-Zwischenräume ab, sodass das gesamte Wasser entfernt ist.
6. Überprüfen Sie die Verschlussfolien auf Spuren von Wasser. Wenn Wasser zu sehen ist, tupfen Sie die Folie mit einem fusselfreien Tuch trocken.
7. Überprüfen Sie jeweils die Unterseite der einzelnen Kartuschen, um sicherzustellen, dass die Behälter frei von Eis sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Reagenzien aufgetaut sind.
8. Invertieren Sie die einzelnen Kartuschen 10-mal, um die Reagenzien zu mischen.



VORSICHT

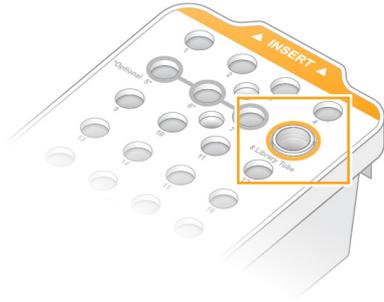
Wenn die Kartuschen nicht gründlich invertiert werden, kann dies die Datenqualität beeinträchtigen.

9. Klopfen Sie die Unterseite von jeder Kartusche leicht auf den Tisch, um die Anzahl von Luftblasen zu verringern.

Laden von Bibliotheksröhrchen

1. Setzen Sie das Bibliotheksröhrchen mit dem denaturierten und verdünnten Bibliothekspool ohne Kappe in Position **Library Tube** (Bibliotheksröhrchen) (Nr. 8) der Clusterkartusche, ohne dabei die Bibliothek am Boden des Röhrchens aufzurütteln.
2. Setzen Sie das leere Bibliotheksröhrchen ohne Kappe in Position 8 der Clusterkartusche ein.

Abbildung 5 In Position 8 geladenes Bibliotheksrohrchen ohne Kappe



Leeren der Flaschen für benutzte Reagenzien

Leeren Sie bei *jedem* Sequenzierungslauf die Flaschen für benutzte Reagenzien wie nachfolgend beschrieben. Wenn Ihr System so konfiguriert ist, dass benutzte Reagenzien extern weitergeleitet werden, nimmt die kleine Flasche benutzte Reagenzien auf und muss nach jedem Sequenzierungslauf geleert werden. Die große Flasche muss eingesetzt sein.

1. Entfernen und leeren Sie die kleine Flasche für benutzte Reagenzien wie nachfolgend beschrieben.
 - a. Ziehen Sie den Hebel nach oben und entfernen Sie die kleine Flasche für benutzte Reagenzien aus der Nische. Fassen Sie die Flasche an den Seiten.
 - b. Entfernen Sie die Schraubkappe von der Kappenhalterung an der Vorderseite der Flasche.
 - c. Verschließen Sie die Flaschenöffnung mit der Kappe, damit nichts verschütten werden kann.
 - d. Halten Sie den Inhalt vom Inhalt der anderen Flasche getrennt und entsorgen Sie ihn gemäß den in Ihrer Region geltenden Vorschriften.
 - e. Platzieren Sie die Flasche ohne Kappe in der Nische und bewegen Sie dann den Hebel nach unten. Bewahren Sie die Kappe auf der Kappenhalterung auf.
2. Entfernen und leeren Sie die große Flasche für benutzte Reagenzien wie nachfolgend beschrieben.
 - a. Verwenden Sie den oberen Griff, um die große Flasche für benutzte Reagenzien links in der Pufferschublade zu entfernen.
 - b. Entfernen Sie die Schraubkappe von der Kappenhalterung an der Vorderseite der Flasche.
 - c. Verschließen Sie die Flaschenöffnung mit der Kappe, damit nichts verschütten werden kann.
 - d. Entsorgen Sie den Inhalt der Flasche gemäß den in Ihrer Region geltenden Vorschriften. Halten Sie beim Entleeren beide Griffe fest.
 - e. Positionieren Sie die Flasche ohne Kappe wieder in der Pufferschublade. Bewahren Sie die Kappe auf der Kappenhalterung auf.

Abbildung 6 Zurückstellen der leeren Flasche



3. Ziehen Sie ein neues Paar ungepudertes Handschuhe an.

**VORSICHT**

Ziehen Sie immer, nachdem Sie die gebrauchte Reagenzienflasche angefasst haben, ein neues Paar Handschuhe an.

4. Schließen Sie die Pufferschublade und anschließend die Flüssigkeitskammertüren.

**VORSICHT**

Werden die Flaschen für benutzte Reagenzien nicht geleert, kann dies den Abbruch eines Laufs und das Austreten von Reagenzien zur Folge haben. Letzteres kann das Gerät beschädigen und stellt ein Sicherheitsrisiko dar.

Vorbereiten der Fließzelle

1. Nehmen Sie ein neues, verpacktes Fließzellenpaket aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 bis 8 °C.
2. Legen Sie die versiegelte Fließzellenpackung bei Umgebungstemperatur (19–25 °C) für 10 bis 15 Minuten beiseite.
Verwenden Sie die Fließzelle nach dem Entnehmen aus der Verpackung innerhalb von 12 Stunden.

Laden der Verbrauchsmaterialien

Starten Sie die Einrichtung des Laufs und laden Sie die Verbrauchsmaterialien gemäß der folgenden Anweisungen.

1. Wählen Sie im Hauptmenü die Option **Sequence** (Sequenzieren) aus und anschließend einen Lauf mit einer oder zwei Fließzellen:
 - **A+B**: Konfigurieren Sie einen Lauf mit zwei Fließzellen.

- **A:** Konfigurieren Sie einen Lauf mit einer Fließzelle auf Seite A.
- **B:** Konfigurieren Sie einen Lauf mit einer Fließzelle auf Seite B.

Das System startet die Einrichtung des Laufs, beginnend mit dem Laden der Fließzelle.

2. Wählen Sie **OK** aus, um die Warnung zu bestätigen, und öffnen Sie die Fließzellentür.



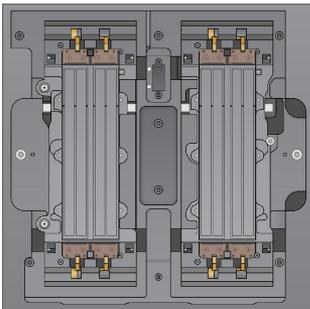
VORSICHT

Halten Sie die Oberfläche während des Sequenzierungslaufs frei von Gegenständen und lehnen Sie sich nicht gegen das Gerät. Druck auf die Fließzellentür führt u. U. dazu, dass sich diese öffnet, wodurch der Lauf angehalten wird. Ein angehaltener Lauf kann nicht fortgesetzt werden.

Laden der Fließzelle

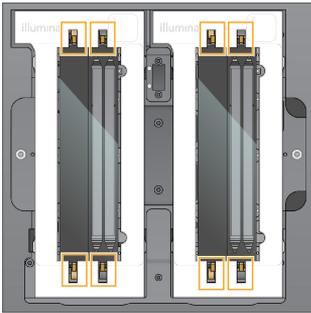
1. Entfernen Sie ggf. die Fließzelle des vorherigen Laufs.
2. Sollten Partikel auf dem Fließzellentisch sichtbar sein, reinigen Sie den kompletten Tisch, einschließlich der Glasoberfläche des Ziels für die Justierung der Optik, mit einem Alkoholtupfer. Trocknen Sie sie mit einem fusselfreien Tuch.

Abbildung 7 Fließzellentisch



3. Nehmen Sie die Fließzelle so aus der Verpackung.
 - a. Ziehen Sie ein neues Paar ungepudertes Handschuhe an, um eine Kontaminierung der Glasoberfläche der Fließzelle zu vermeiden.
 - b. Halten Sie die Verpackung über eine glatte Oberfläche und reißen Sie die Folie von der Ecklasche aus auf.
 - c. Entfernen Sie die durchsichtige Kunststoffhalterung von der Fließzelle.
 - d. Nehmen Sie die Fließzelle aus der Verpackung. Halten Sie die Fließzelle an den Seiten, um das Glas oder die Dichtungen an der Unterseite nicht zu berühren.
 - e. Wenn Partikel auf einer der Glasoberflächen sichtbar sind, reinigen Sie die jeweilige Oberfläche mit einem fusselfreien Alkoholtupfer und trocknen Sie sie mit einem fusselfreien Labortuch.
 - f. Entsorgen Sie die Verpackung ordnungsgemäß.
4. Richten Sie die Fließzelle über den vier hervorstehenden Klemmen aus und platzieren Sie sie auf dem Fließzellentisch.

Abbildung 8 Über den Klemmen ausgerichtete geladene Fließzellen



5. Wählen Sie **Close Flow Cell Door** (Fließzellentür schließen).

Die Fließzellentür wird geschlossen, die Sensoren und die RFID werden überprüft und die ID der Fließzelle wird auf dem Bildschirm angezeigt.

Laden der SBS- und Clusterkartuschen

1. Öffnen Sie die Flüssigkeitskammertüren und dann die Reagenzienkühlertür.
2. Entfernen Sie die gebrauchten SBS- und Clusterkartuschen, falls vorhanden, von einem vorherigen Lauf. Die Verschlussfolien benutzter Kartuschen sind durchstochen.
3. Entsorgen Sie die nicht verbrauchten Inhalte gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften. Weitere Informationen zur sicheren Entsorgung von Position 30 der Clusterkartusche finden Sie unter [Lösen von Position 30 auf Seite 21](#).
4. Laden Sie die vorbereiteten Kartuschen so in die Reagenzienkühlerschublade, dass die mit Insert (Einsetzen) beschrifteten Etiketten zur Hinterseite des Geräts zeigen.
 - Platzieren Sie die SBS-Kartusche (graues Etikett) in der linken Position.
 - Platzieren Sie die Clusterkartusche (orangefarbenes Etikett) mit dem Bibliotheksröhrchen ohne Kappe in der rechten Position.

Abbildung 9 Geladene Reagenzienkartuschen



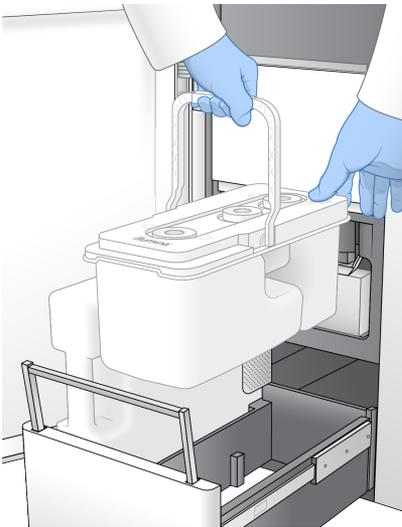
5. Schieben Sie die Schublade in den Kühler und schließen Sie die Reagenzienkühlertür.

Die Sensoren und die RFIDs werden überprüft. Die IDs für das Bibliotheksröhrchen und die zwei Kartuschen werden auf dem Bildschirm angezeigt.

Einsetzen der Pufferkartusche

1. Ziehen Sie am Metallgriff, um die Pufferschublade zu öffnen.
2. Entfernen Sie die benutzte Pufferkartusche auf der rechten Seite der Pufferschublade. Die Verschlussfolien benutzter Pufferkartuschen sind durchstochen.
3. Setzen Sie eine neue Pufferkartusche so in die Pufferschublade ein, dass die Aufschrift Illumina zur Vorderseite der Schublade zeigt. Richten Sie die Kartusche an den hervorstehenden Führungen am Schubladenboden und an den Seiten aus.
Wenn die Pufferkartusche richtig geladen wurde, sitzt sie gleichmäßig und die Schublade lässt sich schließen.

Abbildung 10 Einsetzen der Pufferkartusche



4. Aktivieren Sie, wenn beide Flaschen für benutzte Reagenzien geleert wurden, das Kontrollkästchen, um zu bestätigen, dass beide Flaschen für benutzte Reagenzien leer sind.

HINWEIS

Werden die Flaschen für benutzte Reagenzien nicht geleert, kann dies den Abbruch eines Laufs und das Austreten von Reagenzien zur Folge haben. Letzteres kann das Gerät beschädigen und stellt ein Sicherheitsrisiko dar.

5. Wenn Verbrauchsmaterialien hinzugefügt wurden, wählen Sie **„Run Selection“** (Laufauswahl) aus, um fortzufahren.

Auswählen und Starten vom Lauf

Das Gerät scannt die Bibliotheksrohrchen-ID und sucht nach einem passenden geplanten Lauf.

1. Wenn für jede benutzte Seite ein geplanter Lauf gefunden wird, der mit der Bibliotheksrohrchen-ID übereinstimmt, wird die Laufauswahl übersprungen. Wählen Sie **„Review“** (Überprüfen) aus, um fortzufahren.

2. Wenn für eine oder beide Seiten kein passender Lauf vorhanden ist, wählen Sie „**Run Selection**“ (Laufauswahl) und dann einen oder mehrere geplante Läufe aus.
Es kann nicht für beide Seiten derselbe geplante Lauf ausgewählt werden.
3. Wenn ein oder mehrere Läufe ausgewählt sind, wählen Sie „**Pre-Run Checks**“ (Selbsttests) aus.
4. Warten Sie etwa 5 Minuten, bis die Selbsttests abgeschlossen sind.
Nach erfolgreichem Abschluss startet der Lauf automatisch.

HINWEIS Damit die Festplatte nicht zu voll wird, kopieren Sie keine Daten auf das Laufwerk C:\, sobald der Lauf gestartet wurde.

Fehler beim Selbsttest

1. Wenn die Selbsttests aufgrund eines Sensorfehlers fehlschlagen, z. B. wenn die Fließzelle nicht erkannt wird, muss der Arbeitsablauf beendet und neugestartet werden.
2. Wählen Sie bei anderen Selbsttestfehlern „**Retry**“ (Wiederholen) aus, um den fehlerhaften Selbsttest zu wiederholen, oder wählen Sie „**Retry All**“ (Alle wiederholen), um alle Selbsttests zu wiederholen.
Fehler müssen vor dem Start des Laufs behoben werden.
3. Wählen Sie das Symbol „**Error**“ (Fehler) aus, um die Einzelheiten zum Fehler aufzurufen.
4. Wenn der Alignment-Selbsttest fehlschlägt, beheben Sie so den Fehler:
 - a. Wählen Sie „**Reload**“ (Erneut laden) und anschließend „**OK**“ aus, um zum Bildschirm „**Load**“ (Laden) zurückzukehren.
 - b. Entfernen Sie alle sich auf dem Gerät befindenden Gegenstände und wählen Sie „**OK**“ aus. Die Fließzellentür wird geöffnet.
 - c. Laden Sie die Fließzelle erneut und wählen Sie „**Run Setup**“ (Einrichten des Laufs) aus.
 - d. Befolgen Sie die Anweisungen auf den folgenden Bildschirmen. Die RFID wird erneut gelesen und Sie werden zum Bildschirm „**Pre-Run Checks**“ (Selbsttests) zurückgeleitet.
 - e. Wiederholen Sie den Selbsttest.

Überwachen des Lauffortschritts

Die folgenden Einzelheiten werden auf dem Bildschirm „**Sequencing**“ (Sequenzierung) angezeigt, während der Lauf läuft. Sie können den Bildschirm „**Sequencing**“ (Sequenzierung) über das Hauptmenü aufrufen.

- **Status einzelner Laufschnitte**
- **Laufdauer:** Das Datum und die Uhrzeit (JJJJ-MM-TT hh:mm) des Laufendes.
- **Lauffortschritt:** Der aktuelle Laufschnitt. Die Größe des Balkens der Fortschrittsanzeige ist nicht proportional zur Laufgeschwindigkeit der einzelnen Schritte.
- **Q-Scores:** Die Verteilung der Qualitäts-Scores (Q-Scores).

- **Intensität:** Der Wert der Clusterintensitäten von 90 % der Daten für jede Platte. Plot-Farben kennzeichnen die roten und grünen Kanäle.
- **Cluster nach Filterung (%):** Der Prozentsatz der Cluster nach Filterung.
- **Erwartetes Gesamtergebnis (GB):** Das erwartete Gesamtergebnis für den Fließzellenlauf. Wenn die Metriken für einzelne Lanes (H) ausgewählt sind, geben die Zahlen das aktuelle Ergebnis für die einzelnen Lanes an und werden mit jedem Lauf-Zyklus aktualisiert.
- **Q30:** Der Prozentsatz der Base-Calls für den Lauf, deren Q-Score ≥ 30 ist.

Statussymbole

Ein Statussymbol auf der Oberfläche des NVOS zeigt den Laufstatus an. Eine Zahl auf dem Symbol zeigt die Anzahl der Zustände für einen Status an.

Ändert sich der Laufstatus, blinkt das Symbol. Wählen Sie das Symbol, um eine Beschreibung der Zustände anzuzeigen. Wählen Sie **Acknowledge** (Bestätigen) aus, um die Meldung zu löschen, und dann **Close** (Schließen), um das Dialogfeld zu schließen.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status OK	Das System funktioniert normal.
	Verarbeitung	Das Gerät führt die Verarbeitung durch.
	Warnung	Eine Warnung ist aufgetreten und muss überprüft werden. Warnungen stoppen einen Lauf nicht und es ist keine Aktion erforderlich, damit der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Fehler	Ein Fehler ist aufgetreten. Bei Fehlern sind Maßnahmen erforderlich, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Information	Es ist eine unkritische Meldung ist verfügbar.

Laufkennzahlen

Die Software zeigt Kennzahlen an, die während des Laufs generiert wurden. Die Kennzahlen werden in Form von Schaubildern, Diagrammen und Tabellen dargestellt und basieren auf den Daten, die von RTA3 generiert und in InterOp-Dateien geschrieben wurden.

Das Clustering dauert ungefähr 2 Stunden, dann beginnt die Sequenzierung mit Zyklus 1. Die Kennzahlen werden während der Sequenzierung aktualisiert. Die Kennzahlen für Cluster nach Filterung, Ergebnis und Qualitätsbewertungen sind nach Zyklus 26 verfügbar. Bis Zyklus 26 wird statt Werten „N/A“ angegeben.

Nach der Sequenzierung

Die folgenden Abschnitte enthalten Anweisungen zu Schritten, die nach Abschluss der Sequenzierung ausgeführt werden.

Automatische Nachwaschung

Nach Abschluss der Sequenzierung beginnt die Software eine automatische Nachwaschung, die etwa 80 Minuten dauert. Das System pumpt 0,24%ige Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung aus Position 17 und verdünnt sie auf 0,12 %. Die 0,12%ige NaOCl-Lösung wird in das ExAmp-Reagenz und in die Bibliothekspositionen, durch die Fließzelle und anschließend in die Flaschen für benutzte Reagenzien gepumpt. Der Waschlauf spült Matrizen aus dem System, um eine Kreuzkontaminierung zu verhindern.

Nach Abschluss des Waschlaufs wird das System in einen sicheren Zustand versetzt und die Schaltfläche „Home“ (Start) wird aktiviert. Belassen Sie die Verbrauchsmaterialien bis zum nächsten Lauf in ihrer Position. Nach dem Waschlauf bleiben die Sipper in den SBS- und Clusterkartuschen, wodurch verhindert wird, dass Luft in das System eindringt. Die Sipper in der Pufferkartusche werden angehoben, sodass die Flaschen für benutzte Reagenzien geleert werden können. Dann wird Waschpuffer durch alle Leitungen gepumpt, um NaOCl und Reagenzien aus dem System zu entfernen.

HINWEIS Ein Wartungswaschlauf ist erforderlich, wenn während einer automatischen Nachwaschung ein Fehler auftritt und die Nachwaschung nicht vollständig durchgeführt wird.

Lösen von Position 30

Der Behälter in Position 30 der Clusterkartusche enthält Formamid. Er wird aus der verwendeten Clusterkartusche entfernt und separat entsorgt.



VORSICHT

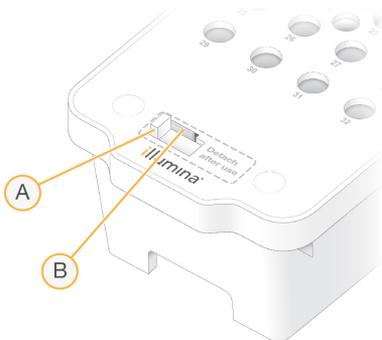
Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.

1. Drücken Sie mit Handschuhen die weiße, mit **Detach after use** (Lösen nach Gebrauch) gekennzeichnete Kunststoffzunge nach rechts.

- Halten Sie eine Hand oder einen stabilen flachen Gegenstand unter den Behälter und drücken Sie die durchsichtige Kunststoffzunge in Richtung der Aufschrift „illumina“, um den Behälter unterhalb der Clusterkartusche zu entfernen.

HINWEIS Stapeln Sie die Clusterkartuschen bei der Aufbewahrung nicht. Durch das Stapeln kann der Behälter versehentlich gelöst werden.

Abbildung 11 Entfernbare Position 30



- A. Weiße Kunststoffzunge zum Lösen
- B. Durchsichtige Kunststoffzunge zum Entfernen

- Entsorgen Sie den Behälter gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften.

Sequenzierungsausgabe

Während der Sequenzierung werden Daten automatisch vom NovaSeq 6000Dx Gerät an den Illumina DRAGEN-Server übertragen. Wenn die Primäranalyse abgeschlossen und die Datenübertragung abgeschlossen ist, kann die Sekundäranalyse auf dem Illumina DRAGEN-Server automatisch beginnen, wobei die Analyseoptionen angewandt werden, die von der im Lokalen Laufmanager ausgewählten Anwendung definiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse hängen von den während der Laufeinrichtung gewählten Optionen ab. Wählen Sie zum Aufrufen der Ergebnisse eines Laufs im Bildschirm „Runs“ (Läufe) unter der Registerkarte „Completed“ (Abgeschlossen) den gewünschten Laufnamen aus. Sie finden die Ausgabedateien auch an dem Speicherort, der auf dem Bildschirm „Instrument Settings“ (Geräteeinstellungen) angegeben ist.

Echtzeitanalyse (Real-Time Analysis)

Auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät wird RTA3, eine Implementierung der Echtzeitanalyse (Real-Time Analysis)-Software, auf der Compute Engine (CE) des Instruments ausgeführt. RTA3 extrahiert Intensitäten aus Bildern, die von der Kamera empfangen werden, führt Base-Calling durch, weist Base-Calls einen Qualitäts-Score zu, richtet sich an PhiX aus und meldet Daten in InterOp-Dateien.

Zur Optimierung der Verarbeitungszeit legt RTA3 die Informationen im Speicher ab. Wenn RTA3 abgeschlossen ist, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und alle Laufdaten, die im Speicher verarbeitet werden, gehen verloren.

RTA3-Eingaben

RTA3 erfordert zur Verarbeitung Plattenbilder, die im lokalen Systemspeicher enthalten sind. RTA3 empfängt Laufinformationen und Befehle vom NVOS.

RTA3-Ausgaben

Bilder von jedem Farbkanal werden gespeichert und als Platten an RTA3 übergeben. RTA3 gibt von diesen Bildern mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filterdateien aus. Alle anderen Ausgaben sind ergänzende Dateien für die Ausgabe.

Dateityp	Beschreibung
Base-Call-Dateien	Die einzelnen analysierten Platten sind in einer verknüpften Base-Call-Datei (*.cbcl) enthalten. Platten derselben Lane oder Oberfläche werden in einer CBCL-Datei für die jeweilige Lane und Oberfläche aggregiert.
Filterdateien	Die einzelnen Platten produzieren jeweils eine Filterdatei (*.filter), die angibt, ob ein Cluster die Filter passiert.

RTA3 stellt Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität in Form von InterOp-Dateien zur Verfügung. InterOp-Dateien sind Binärdateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene.

Fehlerbehebung

RTA3 erstellt Protokolldateien und speichert sie im Ordner „Logs“ (Protokolle). Fehler werden in einer Textdatei im Dateiformat *.log aufgezeichnet.

Wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist, werden die folgenden Protokolldateien an das endgültige Ausgabeziel übertragen:

- In `info_00000.log` ist eine Zusammenfassung wichtiger Laufereignisse enthalten.
- In `error_00000.log` werden während des Laufs aufgetretene Fehler protokolliert.
- In `warning_00000.log` werden während des Laufs aufgetretene Warnungen protokolliert.

Fließzellenplatten

Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle. Die Kamera nimmt ein Bild von jedem Bildstreifen auf, das die Software dann in Platten für die Verarbeitung mit RTA3 unterteilt. Die Gesamtanzahl der Platten hängt davon ab, wie viele Lanes, Bildstreifen und Oberflächen auf der Fließzelle aufgenommen werden.

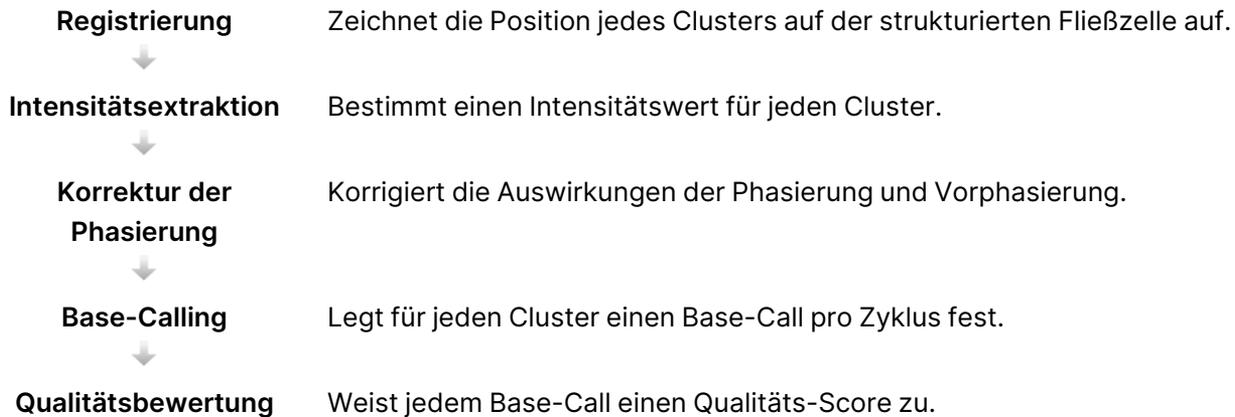
- S2-Fließzellen verfügen über insgesamt 1.408 Platten.
- S4-Fließzellen verfügen über insgesamt 3.744 Platten.

Fließzellenkomponente	S2	S4	Beschreibung
Lanes	2	4	Eine Lane ist ein physischer Kanal mit Einlass- und Auslassöffnungen.
Oberflächen	2	2	Bei S2- und S4-Fließzellen werden zwei Oberflächen aufgenommen: die obere und die untere. Die obere Oberfläche einer Platte wird zuerst abgebildet.
Bildstreifen pro Lane	4	6	Ein Bildstreifen ist eine Spalte in einer Fließzellen-Lane, die die Kamera als gescanntes Bild erfasst.
Platten je Bildstreifen	88	78	Eine Platte ist ein Teil eines Bildstreifens und stellt einen abgebildeten Bereich auf der Fließzelle dar.
Gesamtanzahl generierter Platten	1.408	3.744	Lanes x Oberflächen x Bildstreifen x Platten je Bildstreifen ergibt die Gesamtanzahl Platten.

Der Plattenname ist eine fünfstellige Zahl, die die Plattenposition der Fließzelle darstellt. Beispielsweise gibt der Plattenname 1_1205 Folgendes an: Lane 1, obere Oberfläche, Bildstreifen 2, Platte 5.

- Die erste Ziffer gibt die Lane-Nummer an:
 - 1 oder 2 für eine S2-Fließzelle.
 - 1, 2, 3 oder 4 für eine S4-Fließzelle.
- Die zweite Zahl gibt die Oberfläche an: 1 für die Oberseite und 2 für die Unterseite.
- Die dritte Ziffer gibt die Bildstreifennummer an:
 - 1, 2, 3 oder 4 für eine S2-Fließzelle.
 - 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 für eine S4-Fließzelle.
- Die letzten beiden Ziffern geben die Plattennummer an. Die Plattennummerierung beginnt bei 01 am Auslassende der Fließzelle und reicht bis 88 oder 78 am Einlassende.
 - 01 bis 88 für eine S2-Fließzelle.
 - 01 bis 78 für eine S4-Fließzelle.

Real-Time Analysis-Workflow



Registrierung

Bei der Registrierung wird auf der strukturierten Fließzelle ein Bild auf dem gedrehten Quadrat-Array mit Nanowells ausgerichtet. Aufgrund der geordneten Struktur der Nanowells sind die X- und Y-Koordinaten der einzelnen Cluster einer Platte vorbestimmt. Die Clusterpositionen des jeweiligen Laufs werden in einer Clusterpositionsdatei (s.locs) gespeichert.

Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt.

Intensitätsextraktion

Nach der Registrierung berechnet die Intensitätsextraktion einen Intensitätswert für jeden Nanowell in einem bestimmten Bild. Schlägt die Registrierung fehl, kann die Intensität für diese Platte nicht extrahiert werden.

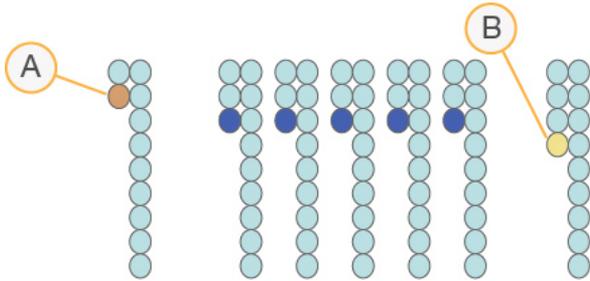
Korrektur der Phasierung

Während der Sequenzierungsreaktion erweitert sich jeder DNA-Strang in einem Cluster um eine Base pro Zyklus. Die Phasierung und Vorphasierung finden statt, wenn eine Phasenverschiebung eines Strangs mit dem aktuellen Inkorporationszyklus eintritt.

Eine Phasierung tritt ein, wenn eine Basenintegration zurückfällt.

Eine Vorphasierung tritt ein, wenn eine Basenintegration vorausfällt.

Abbildung 12 Phasierung und Vorphasierung



- A. Read mit einer phasierenden Base
- B. Read mit einer vorphasierenden Base

RTA3 korrigiert die Auswirkungen der Phasierung und der Vorphasierung, sodass bei jedem Zyklus des Laufs eine maximale Datenqualität erzielt wird.

Base-Calling

Beim Base-Calling wird eine Base (A, C, G oder T) für jeden Cluster einer bestimmten Platte eines bestimmten Zyklus festgelegt. Das NovaSeq 6000Dx Gerät verwendet eine Zweikanal-Sequenzierung, bei der nur zwei Bilder benötigt werden, um die Daten für vier DNA-Basen zu codieren: ein Bild aus dem roten und ein Bild aus dem grünen Kanal.

Das Ergebnis „No-Call“ wird als N identifiziert. „No-Calls“ treten auf, wenn Cluster die Filter nicht passieren, die Registrierung fehlschlägt oder Cluster außerhalb des Bildes verschoben werden.

Intensitäten für jeden Cluster werden aus den roten und grünen Bildern extrahiert und miteinander verglichen. Dies ergibt vier verschiedene Populationen. Jede Population entspricht einer Base. Der Base-Calling-Prozess bestimmt die Population, zu der jeder Cluster gehört.

Abbildung 13 Darstellung der Clusterintensitäten

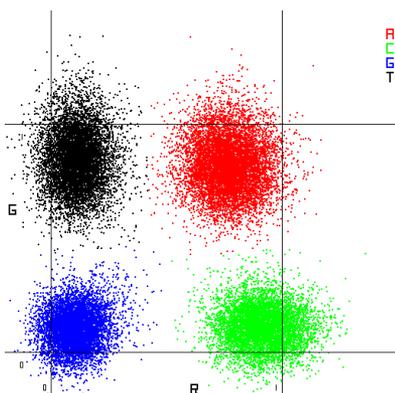


Tabelle 8 Base-Calls bei einer Zweikanal-Sequenzierung

Base	Roter Kanal	Grüner Kanal	Ergebnis
A	1 (ein)	1 (ein)	Cluster, die Intensitäten sowohl im roten als auch im grünen Kanal aufweisen.
C	1 (ein)	0 (aus)	Cluster, die Intensitäten nur im roten Kanal aufweisen.
G	0 (aus)	0 (aus)	Cluster, die keine Intensitäten bei einer bekannten Clusterposition aufweisen.
T	0 (aus)	1 (ein)	Cluster, die Intensitäten nur im grünen Kanal aufweisen.

Cluster nach Filterung

Während des Laufs filtert RTA3 Rohdaten, um Reads zu entfernen, die dem Schwellenwert für Datenqualität nicht genügen. Überlappende Cluster sowie Cluster niedriger Qualität werden entfernt.

Bei der Zweikanalanalyse verwendet RTA3 ein populationsbasiertes System zum Feststellen der Reinheit (Reinheitsmessung der Intensität) eines Base-Calls. Cluster passieren Filter (PF), wenn in den ersten 25 Zyklen höchstens ein Base-Call eine Reinheit unter einem festen Schwellenwert aufweist. Wenn enthalten, wird das PhiX-Alignment im Zyklus 26 für eine Teilmenge von Platten für Cluster durchgeführt, die die Filter passiert haben. Für Cluster, die die Filter nicht passieren, erfolgt kein Base-Call und kein Alignment.

Qualitäts-Scores

Ein Qualitäts-Score (Q-Score) ist eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines falschen Base-Calls. Je höher der Q-Score ist, desto höher ist die Qualität des Base-Calls und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser korrekt ist. Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in CBCL-Dateien gespeichert.

Der Q-Score kommuniziert kurz und bündig kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten. Qualitäts-Scores werden als Q (X) dargestellt, wobei X der Score-Wert ist. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen einem Qualitäts-Score und der Fehlerwahrscheinlichkeit.

Q-Score Q(X)	Fehlerwahrscheinlichkeit
Q40	0,0001 (1 von 10.000)
Q30	0,001 (1 von 1.000)
Q20	0,01 (1 von 100)
Q10	0,1 (1 von 10)

Qualitätsbewertung und Berichterstellung

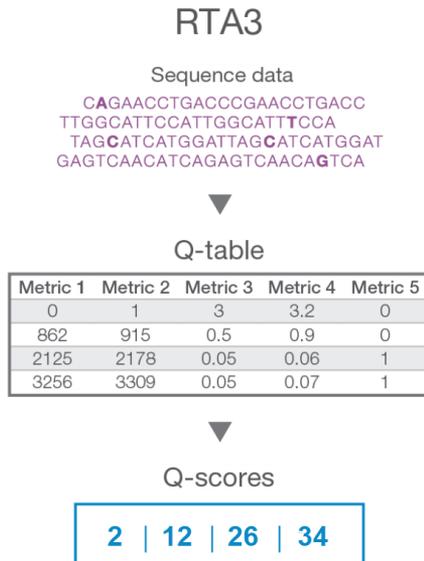
Die Qualitätsbewertung berechnet für jeden Base-Call mehrere Fehlerwahrscheinlichkeiten und ermittelt anhand der Prognosewerte den Q-Score aus einer Qualitätstabelle. Qualitätstabellen werden erstellt, um optimale Qualitätsprognosen für Läufe zu liefern, die auf spezifisch konfigurierten Sequenzierungsplattformen

mit bestimmten Chemie-Versionen durchgeführt werden.

Die Qualitätsbewertung basiert auf einer geänderten Version des Phred-Algorithmus.

Zur Generierung der Q-Tabelle für den NovaSeq 6000Dx Gerät wurden anhand des Clusterings dieser spezifischen Prognosefunktionen drei Gruppen von Base-Calls ermittelt. Im Anschluss an die Gruppierung der Base-Calls wurde die mittlere Fehlerrate für jede der drei Gruppen empirisch berechnet und die entsprechenden Q-Scores wurden gemeinsam mit den zu den Gruppen gehörigen Prognosefunktionen in die Q-Tabelle aufgenommen. Daher sind bei RTA3 nur drei Q-Scores möglich. Diese Q-Scores entsprechen der durchschnittlichen Fehlerrate der Gruppe. Alles in allem ergibt sich hieraus eine vereinfachte, jedoch hochpräzise Qualitätsbewertung. Die drei Gruppen in der Qualitätstabelle stehen für Base-Calls von geringer Qualität (< Q15), medium (~Q20), and high-quality (> Q30). Ihnen sind die spezifischen Scores 12, 26 und 34 zugeordnet. Zusätzlich erhalten No-Calls den Null-Score 2. Dieses Berichterstellungsmodell für Q-Score verringert die Speicherplatz- und Bandbreitenanforderungen, ohne dabei die Genauigkeit oder die Performance zu beeinträchtigen.

Abbildung 14 Vereinfachte Qualitätsbewertung mit RTA3



Sequenzierungsausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Base-Call-Dateien	<p>Jeder analysierte Cluster wird in eine Base-Call-Datei aufgenommen, zusammengefasst in einer Datei je Zyklus, Lane und Oberfläche. Die zusammengefasste Datei enthält den Base-Call und den codierten Qualitäts-Score für jeden Cluster.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1</p> <p>L[lane]_[surface].cbcl, zum Beispiel L001_1.cbcl</p>

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Clusterpositionsdateien	Für jede Fließzelle enthält eine binäre Clusterpositionsdatei die XY-Koordinaten für jeden Cluster in einer Platte. Eine sechseckige Anordnung, die der Nanowell-Anordnung der Fließzelle entspricht, definiert die Koordinaten vor. Data\Intensities s_[lane].locs
Filterdateien	Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Für jede Platte wird eine Filterdatei erstellt. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Laufinformationsdatei	Enthält den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen in jedem Read, die Angabe, ob der Read ein Index-Read ist, sowie die Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle. Die Laufinformationsdatei wird am Anfang des Laufs generiert. [Root folder],RunInfo.xml
Miniaturbilddateien	Miniaturbilder für den ersten Zyklus jedes Sequenzierungs-Read. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]: Für jeden Zyklus werden Dateien in einem Unterordner gespeichert. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg: Das Miniaturbild enthält die Plattennummer.

Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabe

Der NVOS generiert den Namen des Ausgabeordners automatisch.

 **Config:** Enthält Konfigurationsdateien für den Lauf.

 **Logs:** Enthält Protokolldateien, die Betriebsschritte, Geräteanalysen und RTA3-Ereignisse beschreiben.

 SampleSheet.csv: Probenblatt oder eine andere angehängte Datei, falls zutreffend.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]:** Base-Call-Dateien (*.cbcl), zusammengefasst in einer Datei je Lane, Oberfläche und Zyklus.

 s.locs: Die Cluster-Positionsdatei für den Lauf.

 **InterOp:** Binärdateien.

 **Recipe:** Laufspezifische Rezepturdatei.

 **Thumbnail Images:** Miniaturbilder für jede zehnte Platte.

 **LIMS:** Die Laufeinrichtungsdatei (*.json), falls zutreffend.

 **Audit** AuditInfo.xml RTA3.cfg RunInfo.xml RunParameters.xml RTAComplete.txt CopyComplete.txt SequenceComplete.txt IlluminaRunManagerCopyComplete.txt Manifest.tsv

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen



VORSICHT

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

- **Einige Komponenten der von Illumina bereitgestellten Reagenzien für das NovaSeq 6000Dx Gerät enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Personen können sich durch Inhalation, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften.** Weitere umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet, SDS) unter support.illumina.com/sds.html.
- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Probenqualität führen.
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien gründlich die Hände.
- Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Instrumenten und Proben genomischer DNA durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.

- Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontamination sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über dafür vorgesehene Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Hitzeblöcke, Vortexer und Zentrifugen) verfügen.
- Die Index-zu-Proben-Paarung muss genau dem ausgedruckten Platten-Layout entsprechen. Die Anwendung „DNA Prep with Enrichment“ (DNA-Vorbereitung durch Anreicherung) füllt automatisch die mit den Probenamen verknüpften Index-Primer, wenn sie während der Laufeinrichtung eingegeben werden. Dem Benutzer wird empfohlen, vor dem Start des Sequenzierungslaufs die mit Proben verbundenen Index-Primer zu überprüfen. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.
- Installation Es wird dringend empfohlen, zum Schutz des Computers vor Viren eine (vom Benutzer bereitzustellende) Virenschutz-Software zu installieren.
- Betreiben Sie das NovaSeq 6000Dx nicht, wenn irgendein Gehäuseteil entfernt wurde. Wenn Sie das Gerät betreiben, während eines oder mehrere Gehäuseteile entfernt sind, sind Sie möglicherweise Netz- und Gleichstromspannungen ausgesetzt.
- Berühren Sie nicht den Fließzellentisch in der Fließzellenkammer. Das Heizelement in der Kammer arbeitet bei 22 bis 95 °C, sodass es zu Verbrennungen kommen kann.
- Das Gerät wiegt etwa 480 kg und kann schwere Verletzungen verursachen, wenn es fallen gelassen oder falsch gehandhabt wird.

Leistungsmerkmale

Die Leistungsmerkmale des NovaSeq 6000Dx Geräts wurden unter Verwendung des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx für die Bibliotheksvorbereitung, der NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) für die Sequenzierung und der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx für die Sekundäranalyse ermittelt, einschließlich Keimbahn- und somatischer Variantenerkennung. Die Studien umfassten Probenindizierung, Probenverschleppung, DNA-Zugabe, analytische Sensitivität (Leerwertgrenze/Nachweiskennlinie), Genauigkeit und Präzision sowie Methodenvergleich und Reproduzierbarkeit. Die Leistungsmerkmale bezüglich voranalytischer Faktoren, z. B. Extraktionsmethoden oder störende Substanzen, finden Sie in der *Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Package Insert (Packungsbeilage für Illumina DNA-Vorb. mit Anreicherung Dx)*.

Definitionen von Berechnungen, die bei Leistungsmerkmalen verwendet wurden

1. Die positive prozentuale Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Varianten klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
 - $(\text{Anzahl der Varianten-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci})$

Vom Assay gemeldete Varianten-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind richtig positive Werte (RP). Vom Assay als Referenz-Calls oder unterschiedliche Varianten-Calls gemeldete Varianten-Loci sind falsch negative Werte (FN).

2. Die negative prozentuale Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) wird als der Anteil der von einer Referenzmethode als Wildtyp klassifizierten Loci berechnet, die vom Assay korrekt gemeldet werden.
 - $(\text{Anzahl der Wildtyp-Loci, die vom Assay korrekt gemeldet werden}) / (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci})$Vom Assay gemeldete Wildtyp-Loci, die konkordant mit der Referenzmethode sind, sind richtig negative Werte (RN). Wildtyp-Loci, die vom Assay als Varianten gemeldet werden, sind falsch positive Werte (FP).
3. Die prozentuale Gesamtübereinstimmung (Overall Percent Agreement, OPA) wird als der Anteil der Loci berechnet, die vom Assay in Bezug auf eine Referenzmethode korrekt gemeldet werden.
 - $((\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Varianten-Loci}) + (\text{Anzahl der vom Assay korrekt gemeldeten Wildtyp-Loci})) / ((\text{Gesamtzahl der Varianten-Loci}) + (\text{Gesamtzahl der Wildtyp-Loci}))$
4. Die Berechnungen von PPA, NPA und OPA umfassen keine „No Calls“ (Varianten- oder Referenz-Loci, die einen oder mehrere Qualitätsfilter nicht erfüllen).
5. Der Prozentsatz positiver Calls (PPC) ist die Anzahl der Beobachtungen, bei denen die Variante erkannt wurde, dividiert durch die Gesamtzahl der getesteten Beobachtungen, ausgenommen ungültige Beobachtungen oder solche, die als geringe Tiefe gefiltert wurden.
6. Der Prozentsatz negativer Calls (PNC) wird als Anzahl der Beobachtungen mit Ergebnis bestandene Referenz an einer Position geteilt durch die Gesamtzahl der getesteten Beobachtungen berechnet, ausgenommen ungültige Beobachtungen oder solche, die als geringe Tiefe gefiltert wurden.
7. Der Prozentsatz der Autosomen-Callfähigkeit wird als Prozentsatz der Nicht-N-Referenzpositionen in Targetregionen in autosomalen Chromosomen mit einem bestandenen Genotyp-Call berechnet.

Probenindizierung

Proben-Index-Primer, die während einer Bibliotheksvorbereitung hinzugefügt werden, weisen jeder Proben-DNA eine eindeutige Sequenz zu. Durch diese eindeutigen Sequenzen können mehrere Proben in einem einzigen Sequenzierungslauf zusammengefasst werden. Die Probenindizierung wird beim Arbeitsablauf für Keimbahn-Varianten sowie für somatische Varianten angewendet. Diese Studie verfolgte das Ziel, die minimale (12) und maximale (192) Anzahl von Proben zu bestimmen, die bei einem einzigen Sequenzierungslauf auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät verarbeitet werden können. 12 eindeutige Platinum-Genom-DNA-Proben (NA12877 bis NA12888) wurden mit mindestens 12 unterschiedlichen Kombinationen von Index-Primern je Probe getestet. Die Probenbibliotheken wurde mit einem repräsentativen Assay durchgeführt, der auf die Abfrage vieler Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen auf allen 23 menschlichen Chromosomen abdecken. Die Probenergebnisse aus 4 Sequenzierungsläufen mit Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsabläufen der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurden mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 verglichen.

Für den ersten Satz Läufe wurden 192 eindeutig indizierte Probenbibliotheken in zwei Sequenzierungsläufen sequenziert, jeweils einer mit S2- und S4-Reagenzien, um die maximale Anzahl der unterstützten Indizes sowie die Fähigkeit des Assays zu überprüfen, konsistent einen Genotypisierungs-Call für eine Probe über

verschiedene Indexierungsprimer-Kombinationen hinweg durchzuführen. Anschließend wurden für den zweiten Satz Läufe zwei Sequenzierungsläufe mit 12 eindeutig indizierten Probenbibliotheken durchgeführt, jeweils einer mit S2- und S4-Reagenzien, um die Mindestzahl der unterstützten Indizes zu ermitteln.

Bei den 192-Index-Läufen lag der PPA für SNV im Bereich von 99,7 bis 100 %, der PPA für Insertionen bei 100 %, der PPA für Deletionen im Bereich von 96,7 bis 100 % und der NPA bei 100 %. Bei den 12-Index-Läufen lag der PPA für SNV im Bereich von 99,7 bis 100 %, der PPA für Insertionen bei 89,6 bis 100 %, der PPA für Deletionen im Bereich von 94,6 bis 100 % und der NPA bei 100 %.

Probenverschleppung

Mit dem NovaSeq 6000Dx Gerät können mehrere Proben und Kontrollproben in einem einzigen Sequenzierungslauf sequenziert werden. In einer Studie wurde das Ausmaß der Probenverschleppung in einem Sequenzierungslauf (innerhalb des Laufs) und zwischen Sequenzierungsläufen (von Lauf zu Lauf) untersucht. 12 Platinum-Genom-Proben, 6 männliche und 6 weibliche Proben, wurden mit einem repräsentativen Assay untersucht, das auf die Abfrage verschiedener Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über 23 menschliche Chromosomen hinweg abdecken, einschließlich beider Geschlechtschromosomen. Die Bibliotheken wurden auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät mit dem Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sequenziert. Die Verschleppung männlicher Proben in weibliche Proben wurde durch das Vorhandensein von Y-Chromosom-Target-Reads in weiblichen Proben beobachtet.

Die Verschleppung innerhalb eines Laufs kann während der Clusterbildung, beim Index-Zyklus-Base-Calling und beim Proben-Demultiplexing auftreten. Zum Testen der Probenverschleppung innerhalb eines Sequenzierungslaufs wurde ein Bibliothekspool, bestehend aus mindestens 12 Replikaten jeder männlichen und weiblichen Probe plus 2 Kontrollen ohne Matrize, für insgesamt 192 eindeutig indizierte Bibliotheken, auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät in zwei Sequenzierungsläufen sequenziert, je einer mit S2- und S4-Reagenzien. Die Probenverschleppung innerhalb des Laufs wurde beurteilt. Dazu wurden die Y-Chromosom-Target-Abdeckung jedes weiblichen Replikats mit der durchschnittlichen Y-Chromosom-Target-Abdeckung aller männlichen Replikate im Pool verglichen. Das 95. Perzentil der beobachteten Verschleppung innerhalb eines Laufs betrug 0,0090 % bzw. 0,041 % für S2- bzw. S4-Reagenzien.

Zum Testen der Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurden zwei Bibliothekspools vorbereitet und nacheinander auf einem NovaSeq 6000Dx Gerät sequenziert, wobei auf Seite A S4-Reagenzien und auf Seite B S2-Reagenzien benutzt wurden. Im ersten Pool waren mindestens 12 Replikate von 6 eindeutigen weiblichen Proben plus 2 Nicht-Matrizen-Kontrollen für insgesamt 96 eindeutig indizierte Bibliotheken enthalten. Im zweiten Pool waren mindestens 12 Replikate von 6 eindeutigen männlichen Proben plus 2 Nicht-Matrizen-Kontrollen für insgesamt 96 eindeutig indizierte Bibliotheken enthalten. In beiden Pools wurde derselbe Satz an Indexadaptern benutzt. Zuerst wurde der Pool aus weiblichen Proben sequenziert, dann folgte ein Sequenzierungslauf mit dem Pool aus männlichen Proben. Anschließend wurde ein erneuter Sequenzierungslauf mit dem Pool der weiblichen Proben durchgeführt. Die Probenverschleppung von Lauf zu Lauf wurde pro Reagenztyp, S2 und S4, beurteilt. Dazu wurde die Y-Chromosom-Target-Abdeckung des

entsprechenden Replikats des Wiederholungslaufs des Pools aus weiblichen Proben und des Laufs mit dem Pool aus männlichen Proben miteinander verglichen. Das 95. Perzentil der beobachteten Verschleppung von Lauf zu Lauf betrug 0,0089 % bzw. 0,012 % für S2- bzw. S4-Reagenzien.

DNA-Zugabe

Blut (Germline)

Der Blut-DNA-Zugabebereich für das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit unter Verwendung der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurde für den NovaSeq 6000Dx festgelegt. Dieser Bereich wurde durch eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 8 Platinum-Genom-Proben (NA12877 bis NA12884) und einem repräsentativen Assay beurteilt, der auf die Abfrage verschiedener Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über 23 menschliche Chromosomen hinweg abdecken. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000Dx Gerät mit dem NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) sequenziert.

7 Proben wurden je 2-mal bei 6 DNA-Zugabestufen von 1.000 ng bis 10 ng (1.000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng und 10 ng) getestet. Eine 8. Probe (NA12884) wurde als einzelnes Replikat bei einer Zugabe von 10 ng und 2-mal für alle anderen Zugabestufen getestet. Für die Bestimmung der Genauigkeit wurden Proben-Genotypen mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 verglichen. Die Ergebnisse wurden für jede Zugabestufe ermittelt. PPA für jeden Variantentyp (SNV, Insertionen und Deletionen) wird in [PPA-Ergebnisse für jede Blut-DNA-Zugabe nach Variantentyp auf Seite 34](#) dargestellt. NPA wird in [NPA für jede Blut-DNA-Zugabe auf Seite 35](#) dargestellt. Alle Zugabestufen hatten eine ähnliche Genauigkeit. Die empfohlene Blut-DNA-Zugabe für das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx beträgt 50 bis 1.000 ng, wobei 1000 ng und 10 ng eine Ober- und Untergrenze darstellen, um die Leistungsmerkmale bei der Sequenzierung auf dem NovaSeq 6000Dx zu erfüllen.

Tabelle 9 PPA-Ergebnisse für jede Blut-DNA-Zugabe nach Variantentyp

DNA-Zugabe (ng)	Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)
10	SNV	69.612	69.538	68	6	99,9
25		74.192	74.105	75	12	99,9
50		74.105	74	13	99,9	
100		74.116	72	4	99,9	
250		74.113	72	7	99,9	
1.000		74.112	73	7	99,9	

DNA-Zugabe (ng)	Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)
10	Insertion	2.732	2.732	0	0	100
25		2.928	2.916	6	6	99,8
50		2.914	8	6	99,7	
100		2.917	6	5	99,8	
250		2.928	0	0	100	
1.000		2.921	5	2	99,8	
10	Deletion	2.084	2.049	4	31	99,8
25		2.240	2.200	9	31	99,6
50		2.207	3	30	99,9	
100		2.199	1	40	> 99,9	
250		2.201	0	39	100	
1.000		2.195	2	43	99,9	

Tabelle 10 NPA für jede Blut-DNA-Zugabe

DNA-Zugabe (ng)	TN	FP	Referenz-No-Calls	NPA (%)
10	115.449.045	384	285.751	> 99,9
25	123.012.157	415	438.153	> 99,9
50	122.985.299	369	465.043	> 99,9
100	122.976.660	321	473.730	> 99,9
250	122.971.099	331	479.289	> 99,9
1.000	122.978.527	324	471.882	> 99,9

FFPE (Somatic)

Der Zugabebereich für in Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) DNA für das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit unter Verwendung der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wurde für NovaSeq 6000Dx festgelegt. Dieser Bereich wurde durch eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 2 Platinum-Genom-Proben und einem repräsentativen Assay beurteilt, der auf die Abfrage verschiedener Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über 23 menschliche Chromosomen hinweg abdecken. Die Bibliotheken wurden auf einem NovaSeq 6000Dx Gerät mit dem NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) sequenziert.

DNA der Probe GM12877 wurde mit DNA der Probe GM12878 verdünnt, um GM12877-13 mit eindeutigen heterozygoten und homozygoten GM12877-Varianten mit Frequenzen von ca. 6,5 % bzw. 13 % zu generieren. Die unverdünnte Probe GM12877 wurde ebenfalls getestet. GM12877-13 wurde je 2-mal bei vier DNA-Zugabestufen von 1.000 ng bis 25 ng (1.000 ng, 250 ng, 50 ng und 25 ng) getestet. GM12877 wurde als einzelnes Replikat bei 250 ng und 2-mal für alle anderen Zugabestufen getestet. Für die Bestimmung der

Genauigkeit wurden Proben-Variantencalls mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 verglichen. Die Ergebnisse wurden für jede Zugabestufe ermittelt. PPA für jeden Variantentyp (SNV, Insertionen und Deletionen) wird in [PPA-Ergebnisse für jede FFPE-Zugabe nach Variantentyp und Target-VAF auf Seite 36](#) dargestellt. NPA wird in [NPA für jede FFPE-DNA-Zugabe auf Seite 36](#) dargestellt. Alle Zugabestufen hatten eine ähnliche Genauigkeit. Für FFPE-Proben mit einem ΔCq -Wert von ≤ 5 beträgt die empfohlene DNA-Zugabe 50 bis 1.000 ng für das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, wobei 1000 ng und 25 ng eine Ober- und Untergrenze darstellen, um die Leistungsmerkmale bei der Sequenzierung auf dem NovaSeq 6000Dx zu erfüllen.

Tabelle 11 PPA-Ergebnisse für jede FFPE-Zugabe nach Variantentyp und Target-VAF

DNA-Zugabe (ng)	Variantentyp	Erwartete Varianten	Zielverdünnung VAF									
			0,065					0,13				
			TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA (%)	
25	SNV	3.000	2.931	8	61	99,7	624	624	0	0	100	
50		3.000	2.930	8	62	99,7	624	622	0	2	100	
250		3.000	2.927	8	65	99,7	624	624	0	0	100	
1.000		3.000	2.921	8	71	99,7	624	624	0	0	100	
25	Insertion	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
1.000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
25	Deletion	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100	
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100	
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100	
1.000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100	

Tabelle 12 NPA für jede FFPE-DNA-Zugabe

DNA-Zugabe (ng)	Erwarteter Wildtyp	TN	FP	Referenz-No-Calls	NPA (%)
25	25.354.119	25.353.706	413	5.499.498	> 99,9
50	27.538.269	27.538.013	256	3.315.421	> 99,9
250	21.562.303	21.561.983	320	1.577.958	> 99,9
1.000	29.030.903	29.030.596	307	1.822.781	> 99,9

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

Diese Studie wurde durchgeführt, um die Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB) und der Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) für den Analyse-Arbeitsablauf der Somatic FASTQ- und VCF-Generierung der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx auf dem zu NovaSeq 6000Dx Gerät bewerten. Die Studie

wurde mit einem repräsentativen Assay durchgeführt, der auf die Abfrage vieler Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen auf allen 23 menschlichen Chromosomen abdecken. Die Platinum-Genom-Zelllinien GM12878 und GM12877 wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde die DNA extrahiert. Verdünnungen von GM12877 in GM12878 wurden hergestellt, um Proben herzustellen, die aus 0 %, 4 %, 6,5 % und 13 % GM12877 nach Volumen bestanden, sodass die Variantenhäufigkeiten von 489 eindeutigen GM12877-Varianten (454 SNV, 17 Insertionen und 18 Deletionen) im Bereich zwischen 0 und 0,13 lagen.

Probenbibliotheken wurden mit zwei Chargen von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien vorbereitet und an sechs aufeinanderfolgenden Starttagen mit zwei NovaSeq 6000Dx Geräten und jeweils zwei Chargen von NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) für insgesamt zwölf Sequenzierumläufe sequenziert. Dies führte zu 288 Beobachtungen für jede Variante in jeder der Probenverdünnungen. Die LoB- und LoD-Werte wurden nach dem klassischen Ansatz gemäß CLSI EP17-A2 berechnet. Die LoB- und LoD-Werte wurden für S2- und S4-Reagenzien separat berechnet. Dazu wurden die Variantenhäufigkeiten aller Varianten im Sequenzierungslauf für jeden Reagenztyp gepoolt. Der Fehler erster Art wurde mit 0,01 und der Fehler zweiter Art mit 0,05 definiert.

Der LoB-Wert wurde für 489 Loci unabhängig über zwei Sequenzierungschargen für jeden Reagenztyp (S2 oder S4) und jede Bibliotheksvorbereitung bewertet. Für S2-Reagenzien betrug das 95. Perzentil LoB 2,9 %. Für S4-Reagenzien betrug das 95. Perzentil LoB 2,2 %.

Der LoD-Wert wurde für 478 von 489 Varianten für S2 und 485 von 489 Varianten für S4 erfolgreich berechnet. Die Varianten, bei denen für eine oder beide Bibliotheksvorbereitungen kein LoD-Wert bestimmt wurde, wurden von der endgültigen LoD-Zuweisung für das NovaSeq 6000Dx System ausgeschlossen. Der LoD-Wert des NovaSeq 6000Dx Systems mit S2- und S4-Reagenzien wurde bestimmt, indem das 95. Perzentil der einzelnen LoD-Varianten genommen wurde. Für S2-Reagenzien betrug das 95. Perzentil über 478 LoD-Varianten 4,8 %. Für S4-Reagenzien betrug das 95. Perzentil über 485 LoD-Varianten 3,9 %.

Genauigkeit

Germline

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Varianten-Calling-Genauigkeit des Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablaufs der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät unter Verwendung des NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) zu beurteilen. Vier einzigartige Platinum-Genom-DNA-Proben wurden mit einem repräsentativen Assay getestet, der darauf ausgelegt ist, eine Vielzahl von Genen abzufragen, die 1.970.505 Basen (9.232 Targets) über alle 23 menschlichen Chromosomen abdecken. Jede der Proben wurde in 12-facher Wiederholung getestet, mit Ausnahme von NA12880, das in 11-facher Wiederholung getestet wurde. Zwei Bediener führten auf drei Sequenzierungsgeräten und mit drei S2-Reagenzienchargen an sechs Starttagen insgesamt 18 Läufe durch. Die Genauigkeit wurde für SNV, Insertionen und Deletionen bestimmt. Dazu wurden die Ergebnisse mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 verglichen.

Tabelle 13 Zusammenfassung der Übereinstimmung des Germline

Kriterien	Beobachtungen insgesamt ¹	Ergebnis der Beobachtung ²	Ergebnis nach Lauf ³
PPA für SNV	846	99,8	99,9
PPA für Insertionen	846	97,9	> 99,9
PPA für Deletionen	846	96,9	99,9
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹Berechnet als die Anzahl der Proben pro Lauf (47) x Anzahl an Läufen (18) = 846.

²Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikation über alle 18 Läufe hinweg.

³Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

[Germline-Übereinstimmung pro Probe auf Seite 39](#) sind die Studiendaten mit positiver und negativer prozentualer Übereinstimmung je Probe enthalten, wobei die Variantenergebnisse mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 für PPA-Berechnungen verglichen werden. Die drei Variantentypen (SNV, Insertionen und Deletionen) werden kombiniert. Da die Referenzmethode nur Ergebnisse für die Einzelnukleotidvarianten und Insertionen/Deletionen liefert, werden Ergebnisse von Basen ohne Varianten für NPA-Berechnungen mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen.

Tabelle 14 Germline-Übereinstimmung pro Probe

Probe	Callfähigkeit von Autosomen	Erwartete Varianten ¹	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273.672	273.452	220	0	414.765.131	931	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12878	99,4	265.680	265.208	234	238	414.803.691	1.193	99,9	> 99,9	> 99,9
NA12879	99,4	261.792	261.792	0	0	414.746.986	1.429	100	> 99,9	> 99,9
NA12880	99,4	246.114	245.551	399	164	380.157.538	1.458	99,8	> 99,9	> 99,9

¹Gesamtzahl der Varianten in allen Probenreplikaten über 18 Läufe hinweg.

[Germline-Übereinstimmung pro Probe nach Variantentyp auf Seite 39](#) sind die Studiendaten je Probe enthalten, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode verglichen werden. Die Erkennung wird für die Variantentypen SNV, Insertionen und Deletionen separat beurteilt. Referenzpositionen sind ausgeschlossen.

Tabelle 15 Germline-Übereinstimmung pro Probe nach Variantentyp

Probe	SVN			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
NA12877	255.096	254.877	219	10.368	10.367	1	8.208	8.208	0
NA12878	250.344	250.077	221	8.424	8.424	0	6.912	6.707	13
NA12879	246.024	246.024	0	8.856	8.856	0	6.912	6.912	0
NA12880	229.482	229.086	396	9.306	9.306	0	7.326	7.159	3

Die Proben wurden weiter auf das Calling kleiner Insertionen und Deletionen (Indels) hin analysiert. Eine Gesamtzusammenfassung finden Sie in der [Zusammenfassung der Germline-Indel-Erkennung auf Seite 39](#). Es gab insgesamt 210 Indels mit 1 bis 18 bp großen Insertionen und 1 bis 21 bp großen Deletionen.

Tabelle 16 Zusammenfassung der Germline-Indel-Erkennung

Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA
Insertion	36.954	36.953	1	0	> 99,9
Deletion	29.358	28.986	16	356	99,9

Der repräsentative Assay umfasste 9.232 Targets, die zahlreiche genomische Inhalte abdeckten. Der GC-Gehalt der Targets lag im Bereich von 0,20–0,86. Die Targets wiesen auch eine Reihe von Einzelnukleotid- (z. B. Poly A, Poly T), Dinukleotid- und Trinukleotid-Replikaten auf. Daten, die auf Chromosomenbasis zusammengestellt wurden, um die Auswirkung des genomischen Inhalts auf den Prozentsatz korrekter Calls zu bestimmen, sind in [Genauigkeit auf Germline-Chromosomenebene auf Seite 40](#) dargestellt. Der Prozentsatz an korrekten Calls beinhaltet Varianten- und Referenz-Calls und liegt unter 100 %, wenn falsche Calls oder „No Calls“ erfolgt sind.

Tabelle 17 Genauigkeit auf Germline-Chromosomenebene

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr1	47	728	138.328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (18), Deletion (4)	[0,22 – 0,8]; Median: 0,51	114.888.718	34	966.860	> 99,9	0,83
Chr2	39	628	159.588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (5), Deletion (2)	[0,24 – 0,81]; Median: 0,44	132.293.464	798	460.345	> 99,9	0,35
Chr3	38	650	137.627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Insertion (11), Deletion (1)	[0,25 – 0,86]; Median: 0,45	114.625.053	2	226.461	> 99,9	0,20

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr4	17	370	737.66	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Insertion (2), Deletion (2)	[0,27 – 0,77]; Median: 0,45	61.872.303	0	66.741	100	0,11
Chr5	25	507	90.008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Insertion (8), Deletion (18)	[0,29 – 0,79]; Median: 0,46	75.314.497	912	153.061	> 99,9	0,20
Chr6	39	453	126.721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Insertion (4), Deletion (2)	[0,24 – 0,79]; Median: 0,48	103.412.695	1	182.361	> 99,9	0,18

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr7	21	450	161.501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (4)	[0,2 - 0,77]; Median: 0,46	132.534.074	19	246.884	> 99,9	0,19
Chr8	18	381	67.775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (1)	[0,26 – 0,78]; Median: 0,47	56.247.612	411	170.925	> 99,9	0,30
Chr9	23	347	87.100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (1)	[0,27 – 0,83]; Median: 0,49	72.650.800	20	241.991	> 99,9	0,33

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr10	14	317	66.723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Insertion (1), Deletion (1)	[0,23 – 0,78]; Median: 0,44	55.539.058	1	18.8216	> 99,9	0,34
Chr11	29	511	91.786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (2)	[0,28 – 0,8]; Median: 0,47	75.744.222	742	259.258	> 99,9	0,34
Chr12	29	577	120.365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Insertion (1), Deletion (5)	[0,26 – 0,77]; Median: 0,49	99.972.530	1	542.005	> 99,9	0,54

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr13	13	283	58.639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Insertion (14), Deletion (0)	[0,28 – 0,79]; Median: 0,42	48.503.179	1	45.666	> 99,9	0,09
Chr14	11	147	26.980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Insertion (4), Deletion (1)	[0,29 – 0,77]; Median: 0,47	22.286.153	198	147.895	> 99,9	0,66
Chr15	15	266	52.091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Insertion (4), Deletion (6)	[0,29 – 0,76]; Median: 0,46	43.600.279	0	99.041	100	0,23
Chr16	21	366	80.030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Insertion (15), Deletion (21)	[0,3 – 0,76]; Median: 0,54	65.490.245	16	1.438.278	> 99,9	2,15

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr17	36	645	118.062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Insertion (18), Deletion (16)	[0,28 – 0,82]; Median: 0,49	97.929.929	417	335.905	> 99,9	0,34
Chr18	9	99	19.195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Insertion (4), Deletion (0)	[0,22 – 0,78]; Median: 0,44	15.967.171	312	42.077	> 99,9	0,26
Chr19	30	605	104.004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (21)	[0,33 – 0,83]; Median: 0,59	85.642.066	3	678.213	> 99,9	0,79
Chr20	12	179	33.795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Insertion (5), Deletion (0)	[0,31 – 0,84]; Median: 0,53	28.108.712	0	38.374	100	0,14

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr21	5	63	30.642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Insertion (2), Deletion (5)	[0,22 – 0,78]; Median: 0,52	25.319.736	50	57.434	> 99,9	0,23
Chr22	10	187	36.727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Insertion (6), Deletion (0)	[0,27 – 0,74]; Median: 0,51	30.258.131	0	42.673	100	0,14
ChrX	23	433	83.576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Insertion (3), Deletion (0)	[0,2 - 0,72]; Median: 0,48	67.318.722	0	770.544	100	1,13
ChrY	0	40	5.476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Deletion (0)	[0,4 - 0,59]; Median: 0,45	0	0	0	n. z.	n. z.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe NA12878 wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (Version 2.19) festgelegt wurde. Von den 9.232 Targets befanden sich 8.009 Targets vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 776 Targets wiesen eine Teilüberlappung und

447 Targets keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 1.831.483 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse werden in der [Germline-Übereinstimmung der Ergebnisse mit der NIST-Datenbank für Probe NA12878 auf Seite 47](#) gezeigt.

Tabelle 18 Germline-Übereinstimmung der Ergebnisse mit der NIST-Datenbank für Probe NA12878

Probe	Anzahl abgedeckter Targets	Callfähigkeit von Autosomen	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8.785	99,4	247.709	218	394.262.149	4.584	> 99,9	> 99,9	> 99,9

Die Daten aus den 18 Läufen der Studie mit dem Germline Variantenmodul belegen, dass das NovaSeq 6000Dx Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- GC-Gehalt ≥ 20 % (alle Base-Calls in 1.692 sequenzierten Targetregionen mit 20 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0 %)
- GC-Gehalt ≤ 86 % (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 86 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0 %)
- Poly-A-Längen ≤ 46 (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 46 Poly-A-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,27 %)
- Poly-T-Längen ≤ 40 (13.384.074 von 13.384.321 Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 40 Poly-T-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,26 %)
- Poly-G-Längen ≤ 11 (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 11 Poly-G-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0 %)
- Poly-C-Längen ≤ 8 (9.815.030 von 9.815.035 Base-Calls in 5.922 sequenzierten Targetregionen mit 8 Poly-C-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,53 %)
- Längen von Dinukleotid-Wiederholungen ≤ 31 -fach (32.233.922 von 32.233.926 Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 31 Dinukleotid-Wiederholungen erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,21 %)
- Längen von Trinukleotid-Wiederholungen ≤ 23 -fach (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 23 Trinukleotid-Wiederholungen erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 0,21 %)
- Insertion-Längen ≤ 18 (alle Base-Calls in 1.692 sequenzierten Targetregionen mit 18 Insertion-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 7,71 %)

- Deletion-Längen ≤ 21 (alle Base-Calls in 1.692 sequenzierten Targetregionen mit 21 Deletion-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 1,14 %)

Somatisch

Mit der hier beschriebenen Studie wurde die Varianten-Calling-Genauigkeit des Somatic FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablaufs der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät unter Verwendung des NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) beurteilt.

In dieser Studie wurde ein repräsentativer Assay benutzt, um verschiedene Gene abzufragen, die 1.970.505 Basen (9.232 Targets) über 23 menschliche Chromosomen hinweg abdecken. Aus FFPE-Blöcken wurde Platinum-Genom-DNA extrahiert, um 4 eindeutige Proben zu generieren, die in der Studie beurteilt werden sollten.

DNA der Probe GM12877 wurde mit DNA der Probe GM12878 verdünnt, um GM12877-13 mit eindeutigen heterozygoten und homozygoten GM12877-Varianten mit Frequenzen von ca. 6,5 % bzw. 13 % zu generieren. DNA der Probe GM12878 wurde mit DNA der Probe GM12877 verdünnt, um GM12878-13 mit eindeutigen heterozygoten und homozygoten GM12878-Varianten mit Frequenzen von ca. 6,5 % bzw. 13 % zu generieren. Die unverdünnten Proben GM12877 und GM12878 wurden ebenfalls getestet. Jede der Proben wurde in 12 Replikaten getestet, mit Ausnahme von GM12878, das in 11 Replikaten getestet wurde. Zwei Bediener führten auf drei Sequenzierungsgeräten und mit drei S4-Reagenzienchargen an sechs Starttagen insgesamt 18 Läufe durch. Die Genauigkeit wurde für SNV, Insertionen und Deletionen bestimmt. Dazu wurden die Ergebnisse mit der Platinum-Genom-Version 2016-1.0 verglichen.

Tabelle 19 Zusammenfassung der Somatic-Übereinstimmung

Kriterien	Anzahl Beobachtungen ¹	Ergebnis der Beobachtungen ²	Ergebnis nach Lauf ³
PPA für somatische SNV	846	99,8	98,9
PPA für somatische Insertionen	846	100	100
PPA für somatische Deletionen	846	100	100
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹ Berechnet als = Anzahl Proben pro Lauf (47) x Anzahl Läufe (18) = 846.

² Niedrigster beobachteter Wert nach Probenreplikat über alle 18 Läufe hinweg.

³ Niedrigster Wert, wenn die Daten aus jedem Lauf aggregiert analysiert werden.

In [Somatic-Übereinstimmung pro Probe auf Seite 49](#) sind die Studiendaten mit positiver und negativer prozentualer Übereinstimmung je Probe enthalten, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode für PPA-Berechnungen verglichen werden. Die drei Variantentypen (SNV, Insertionen und Deletionen) werden kombiniert. Da die Referenzmethode nur Ergebnisse für die Einzelnukleotidvarianten und Insertionen/Deletionen liefert, werden Ergebnisse von Basen ohne Varianten für NPA-Berechnungen mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen.

Tabelle 20 Somatic-Übereinstimmung pro Probe

Probe	Callfähigkeit von Autosomen	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96.228	95.022	198	1.008	365.425.810	1.203	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878	94,5	96.768	96.278	0	490	395.002.023	1.278	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-13	94,7	104.976	103.029	216	1.731	395.989.324	1.286	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878-13	95,2	96.768	96.027	0	741	397.900.884	1.218	100	> 99,9	> 99,9

In [Somatic-Übereinstimmung pro Probe nach Variantentyp auf Seite 49](#) sind die Studiendaten je Probe enthalten, wobei die Variantenergebnisse mit der gut charakterisierten zusammengesetzten Referenzmethode verglichen werden. Die Erkennung wird für die Variantentypen SNV, Insertionen und Deletionen separat beurteilt. Referenzpositionen sind ausgeschlossen.

Tabelle 21 Somatic-Übereinstimmung pro Probe nach Variantentyp

Probe	SNV			Insertionen			Deletionen		
	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN	Erwartet	TP	FN
GM12877	89.694	88.488	198	3.564	3.564	0	2.970	2.970	0
GM12878	92.664	92.390	0	2.160	2.160	0	1.944	1.728	0
GM12877-13	97.848	95.901	216	3.888	3.888	0	3.240	3.240	0
GM12878-13	92.664	92.139	0	2.160	2.160	0	1.944	1.728	0

Die vier Proben wurden weiter auf das Calling kleiner Insertionen und Deletionen (Indels) hin analysiert. Eine Gesamtzusammenfassung finden Sie in der [Zusammenfassung des somatischen Indel-Nachweises auf Seite 50](#). Es gab insgesamt 210 Indels mit 1 bis 18 bp großen Insertionen und 1 bis 21 bp großen Deletionen.

Tabelle 22 Zusammenfassung des somatischen Indel-Nachweises

Variantentyp	Erwartete Varianten	TP	FN	Varianten-No-Calls	PPA
Insertion	11.772	11.772	0	0	100
Deletion	10.098	9.666	0	432	100

Der repräsentative Assay umfasste 9.232 Targets, die zahlreiche genomische Inhalte abdeckten. Der GC-Gehalt der Targets lag im Bereich von 0,20–0,86. Die Targets wiesen auch eine Reihe von Einzelnukleotid- (z. B. Poly A, Poly T), Dinukleotid- und Trinukleotid-Replikaten auf. Daten, die auf Chromosomenbasis zusammengestellt wurden, um die Auswirkung des genomischen Inhalts auf den Prozentsatz korrekter Calls zu bestimmen, sind in [Genauigkeit auf Somatic-Chromosomenebene auf Seite 50](#) dargestellt. Der Prozentsatz an korrekten Calls beinhaltet Varianten- und Referenz-Calls und liegt unter 100 %, wenn falsche Calls oder „No Calls“ erfolgt sind.

Tabelle 23 Genauigkeit auf Somatic-Chromosomenebene

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr1	47	728	138.328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (3), Deletion (0)	[0,22 - 0,8]; Median: 0,51	110.145.939	52	5.642.613	> 99,9	4,9
Chr2	39	628	159.588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Insertion (5), Deletion (1)	[0,24 - 0,81]; Median: 0,44	126.795.713	842	5.850.393	> 99,9	4,4

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr3	38	650	137.627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Insertion (1), Deletion (1)	[0,25 - 0,86]; Median: 0,45	109.902.527	593	4.889.226	> 99,9	4,3
Chr4	17	370	737.66	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Insertion (0), Deletion (1)	[0,27 - 0,77]; Median: 0,45	59.373.461	16	2.517.412	> 99,9	4,1
Chr5	25	507	90.008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Insertion (8), Deletion (18)	[0,29 - 0,79]; Median: 0,46	72.261.191	723	3.116.981	> 99,9	4,1
Chr6	39	453	126.721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Insertion (0), Deletion (1)	[0,24 - 0,79]; Median: 0,48	98.593.101	687	4.890.221	> 99,9	4,7

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr7	21	450	161.501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (4)	[0,2 - 0,77]; Median: 0,46	126.913.574	104	5.773.856	> 99,9	4,4
Chr8	18	381	67.775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Insertion (4), Deletion (0)	[0,26 - 0,78]; Median: 0,47	53.430.489	175	2.958.909	> 99,9	5,2
Chr9	23	347	87.100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Insertion (0), Deletion (1)	[0,27 - 0,83]; Median: 0,49	69.594.586	74	3.260.257	> 99,9	4,5
Chr10	14	317	66.723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Insertion (0), Deletion (0)	[0,23 - 0,78]; Median: 0,44	53.209.592	90	2.469.444	> 99,9	4,4

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr11	29	511	91.786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (2)	[0,28 - 0,8]; Median: 0,47	72.291.795	150	3.665.560	> 99,9	4,8
Chr12	29	577	120.365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Insertion (0), Deletion (3)	[0,26 - 0,77]; Median: 0,49	96.109.352	101	4.331.932	> 99,9	4,3
Chr13	13	283	58.639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Insertion (14), Deletion (0)	[0,28 - 0,79]; Median: 0,42	46.130.028	44	2.384.839	> 99,9	4,9
Chr14	11	147	26.980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Insertion (4), Deletion (0)	[0,29 - 0,77]; Median: 0,47	21.336.891	0	1.078.329	100	4,8

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr15	15	266	52.091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Insertion (4), Deletion (0)	[0,29 - 0,76]; Median: 0,46	41.918.631	184	1.753.300	> 99,9	4,0
Chr16	21	366	80.030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Insertion (15), Deletion (21)	[0,3 - 0,76]; Median: 0,54	62.344.351	18	4.540.539	> 99,9	6,8
Chr17	36	645	118.062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Insertion (18), Deletion (1)	[0,28 - 0,82]; Median: 0,49	93.811.318	414	4.403.622	> 99,9	4,5
Chr18	9	99	19.195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Insertion (0), Deletion (0)	[0,22 - 0,78]; Median: 0,44	15.007.653	6	990.633	> 99,9	6,2

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
Chr19	30	605	104.004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Insertion (2), Deletion (3)	[0,33 - 0,83]; Median: 0,59	81.416.722	455	4.860.311	> 99,9	5,6
Chr20	12	179	33.795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Insertion (5), Deletion (0)	[0,31 - 0,84]; Median: 0,53	26.833.936	7	1.301.905	> 99,9	4,6
Chr21	5	63	30.642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Insertion (1), Deletion (0)	[0,22 - 0,78]; Median: 0,52	24.169.250	44	1.172.087	> 99,9	4,6
Chr22	10	187	36.727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Insertion (6), Deletion (0)	[0,27 - 0,74]; Median: 0,51	28.887.217	86	1.392.179	> 99,9	4,6

Chromosom	Anzahl Gene	Anzahl Targets	Anzahl Basen	Genomischer Inhalt	GC-Bereich	Korrekte Calls	Falsche Calls	No Calls	% korrekte Calls	% No Calls
ChrX	23	433	83.576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Insertion (3), Deletion (0)	[0,2 - 0,72]; Median: 0,48	64.231.080	241	3.852.253	> 99,9	5,7
ChrY	0	40	5.476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Insertion (0), Deletion (0)	[0,4 - 0,59]; Median: 0,45	0	0	0	n. z.	n. z.

Die Sequenzierungsergebnisse der Probe GM12878 wurden mit einem äußerst zuverlässigen Genotyp für NA12878 verglichen, der vom National Institute of Standards and Technology (NIST) (Version 2.19) festgelegt wurde. Von den 9.232 Targets befanden sich 8.009 Targets vollständig innerhalb der äußerst zuverlässigen genomischen Regionen, 776 Targets wiesen eine Teilüberlappung und 447 Targets keine Überlappung in der NIST-Sequenz auf. Daraus ergaben sich 1.831.483 Koordinaten pro Replikat für den Vergleich. Base-Calls ohne Varianten wurden mit der Referenzsequenz des Humangenoms hg19 verglichen. Die Genauigkeitsergebnisse werden in der [Somatic-Übereinstimmung der Ergebnisse mit der NIST-Datenbank für Probe GM12878 auf Seite 56](#) gezeigt.

Tabelle 24 Somatic-Übereinstimmung der Ergebnisse mit der NIST-Datenbank für Probe GM12878

Probe	Anzahl abgedeckter Targets	Callfähigkeit von Autosomen	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8.785	94,5	247.228	0	375.073.821	2.043	100	> 99,9	> 99,9

Die Daten aus den 18 Läufen der Somatic-Studie belegen, dass das NovaSeq 6000Dx Gerät Folgendes konsistent sequenzieren kann:

- GC-Gehalt ≥ 20 % (alle Base-Calls in 1.692 sequenzierten Targetregionen mit 20 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 0,34 %)
- GC-Gehalt ≤ 86 % (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 86 % GC-Gehalt erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 4,21 %)

- Poly-A-Längen ≤ 46 (14.550.082 von 14.550.083 Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 46 Poly-A-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 4,18 %)
- Poly-T-Längen ≤ 40 (12.833.489 von 12.833.491 Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 40 Poly-T-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 4,37 %)
- Poly-G-Längen ≤ 11 (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 11 Poly-G-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 7,59 %)
- Poly-C-Längen ≤ 8 (9.405.604 von 9.405.615 Base-Calls in 5.922 sequenzierten Targetregionen mit 8 Poly-C-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 4,68 %)
- Längen von Dinukleotid-Wiederholungen ≤ 31 -fach (30.996.684 von 30.996.712 Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 31 Dinukleotid-Wiederholungen erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 4,04 %)
- Längen von Trinukleotid-Wiederholungen ≤ 23 -fach (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 23 Trinukleotid-Wiederholungen erfolgten korrekt, mit einer No-Call-Rate von 5,39 %)
- Insertion-Längen ≤ 18 (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 18 Insertion-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 1,44 %)
- Deletion-Längen ≤ 21 (alle Base-Calls in 846 sequenzierten Targetregionen mit 21 Deletion-Wiederholungen erfolgten korrekt, bei einer No-Call-Rate von 7,86 %)

Präzision

Die Präzision des NovaSeq 6000Dx Gerät wurde mit Platinum-Genom-Proben und einem repräsentativen Assay untersucht, das auf die Abfrage mit 9.232 Target-Oligos von verschiedenen Genen ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken. Insgesamt wurden 1.723 gezielte kleine Varianten (SNV, Insertionen und Deletionen) beurteilt. Keimbahntests bestanden aus 11 oder 12 Replikaten von 4 eindeutigen Platinum-Genom-Proben. Somatische Tests bestanden aus 11 oder 12 Replikaten von 4 eindeutigen FFPE-behandelten Platinum-Genom-Proben mit unterschiedlichen VAF-Werten. Probenbibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien vorbereitet.

Die Tests wurden an einem internen Standort mit drei NovaSeq 6000Dx Geräten, jeweils drei Chargen des NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und des NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und zwei Bedienern an sechs Starttagen durchgeführt. Für jeden Starttag wurden Keimbahn-Probenbibliotheken auf einer Geräteseite mit S2-Reagenzien und dem Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sequenziert; somatische Probenbibliotheken wurden auf der anderen Geräteseite mit S4-Reagenzien und dem Somatic FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sequenziert. Diese Tests ergaben jeweils 18 Läufe für den Keimbahn- und für den somatischen Arbeitsablauf.

Germline

Bei Keimbahnläufen werden genomische Positionen, an denen eine gezielte Keimbahnvariante nachgewiesen wird, als positiv (Variante) gemeldet. Für erwartete positive Keimbahnvarianten wurden die Daten innerhalb jedes Variantentyps (SNV, Insertion, Deletion) auf die No-Call-Rate und die Rate des Prozentsatzes positiver Calls (PPC) hin beurteilt. Unter [Laborinterne Präzisions-Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp auf Seite 58](#) werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (Lower Confidence Level, LCL/Upper Confidence Level, UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 25 Laborinterne Präzisions-Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Positive Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	6	980.316	< 0,01	979.854	980.310	99,95	99,95	99,96
Insertion	0	36.738	0	36.738	36.738	100	> 99,99	100
Deletion	18	34.434	0,05	32.160	34.416	93,44	93,18	93,70

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Positiver Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Genomische Positionen, an denen eine Zielvariante nicht nachgewiesen wird, werden als negativ gemeldet (Wildtyp). Für erwartete negative Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und den Prozentsatz negativer Calls (PNC) hin beurteilt. Unter [Laborinterne Präzisions-Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse auf Seite 59](#) werden die beobachteten Raten zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 26 Laborinterne Präzisions-Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Negative Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wildtyp	0	406.170	0	406.170	406.170	100	> 99,99	100

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Negativer Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nicht nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Der Beitrag jedes Parameters (Gerät, Reagenzcharge, Tag, Bibliotheksreplikat) zur Gesamtvariabilität wurde durch Varianzkomponentenanalyse unter Verwendung der Variantenhäufigkeit als Antwortvariable bestimmt. Die Gesamtstandardabweichung hatte einen Mittelwert von 0,0370. Den größten Beitrag zur Variabilität der Variantenhäufigkeit leisteten Replikate der Bibliotheksvorbereitung, die 17,1 % der Gesamtvariabilität ausmachten. Der Tag trug zu 1 % bei, während die Geräten- und Reagenziencharge jeweils zu weniger als 1 % der Gesamtvariabilität unter [Laborinterne Präzisions-Varianzenkomponenten für Keimbahn-Probenvariantenhäufigkeiten auf Seite 59](#) (SD = Standardabweichung [Standard Deviation]) beitrugen.

Tabelle 27 Laborinterne Präzisions-Varianzenkomponenten für Keimbahn-Probenvariantenhäufigkeiten

Komponente	Mittlere SD	Mittlerer % der SD insgesamt
Tag	0,0020	1,028
Gerät	0,0018	0,837
Verbrauchsmaterial	0,0016	0,712
Bibliotheksreplikat	0,0143	17,110
Summe	0,0370	100

Somatisch

Bei somatischen Läufen werden genomische Positionen, an denen eine gezielte somatische Variante nachgewiesen wird, als positiv (Variante) gemeldet. Für die verdünnten Proben GM12877-13 und GM12878-13 mit erwarteten positiven somatischen Varianten bei VAF zwischen 6,5 und 13 % wurden die Daten für die No-Call-Rate und den Prozentsatz positiver Calls (PPC) innerhalb jedes Variantentyps (SNV, Insertion, Deletion) beurteilt. Unter [Laborinterne somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse](#)

nach Variantentyp (VAF ist $\geq 6,5\%$ und $\leq 13\%$) auf Seite 60 werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 28 Laborinterne somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp (VAF ist $\geq 6,5\%$ und $\leq 13\%$)

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Positive Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	96.939	0	96.069	96.939	99,10	99,04	99,16
Insertion	0	3.004	0	3.004	3.004	100	99,87	100
Deletion	0	2.912	0	2.907	2.912	99,83	99,60	99,93

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Positiver Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Genomische Positionen, an denen eine somatische Zielvariante nicht nachgewiesen wird, werden als negativ gemeldet (Wildtyp). Für erwartete negative Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und den Prozentsatz negativer Calls hin beurteilt. Unter [Laborinterne somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse auf Seite 60](#) werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 29 Laborinterne somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Negative Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wildtyp	0	194.922	0	194.919	194.922	> 99,99	> 99,99	100

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Negativer Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nicht nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Der Beitrag jedes Parameters (Gerät, Reagenzcharge, Tag, Bibliotheksreplikate) zur Gesamtvariabilität wurde durch Varianzkomponentenanalyse unter Verwendung der Variantenhäufigkeit als Antwortvariable bestimmt. Die Gesamtstandardabweichung hatte einen Mittelwert von 0,0062. Bibliotheksvorb.replikate blieben die wichtigste Variabilitätsquelle und machten 50,7 % der Gesamtzahl aus. Der Tag, die Geräte und das Verbrauchsmaterial trugen jeweils zu weniger als 1 % der Gesamtvariabilität unter [Laborinterne Präzisions-Varianteigenschaften für somatische Probenvariantenhäufigkeiten auf Seite 61](#) (SD = Standardabweichung) bei.

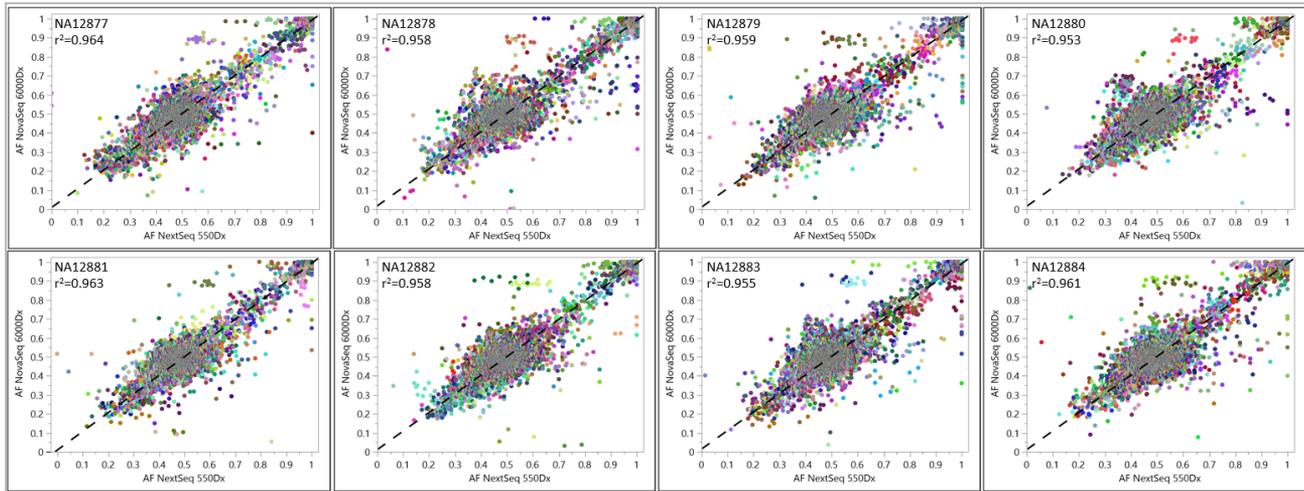
Tabelle 30 Laborinterne Präzisions-Varianzenkomponenten für somatische Probenvariantenhäufigkeiten

Komponente	Mittlere SD	Mittlerer % der SD insgesamt
Tag	0,0002	0,41
Gerät	0,0002	0,40
Verbrauchsmaterial	0,0002	0,35
Bibliotheksreplikate	0,0044	50,7
Summe	0,0062	100

Methodenvergleich

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die Leistung zwischen den Geräten NovaSeq 6000Dx und NextSeq 550Dx zu vergleichen. Die Variantenhäufigkeitsübereinstimmung für Blutproben wurde mit einem repräsentativen Assays beurteilt, die auf die Abfrage vieler Gene ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über alle 23 menschlichen Chromosomen hinweg abdecken. 8 Platinum-Genom-DNA-Proben wurden getestet, 7 in 6 Replikaten und 1 (NA12881) in 5 Replikaten. Bibliotheken wurden auf dem NovaSeq 6000Dx Gerät mithilfe der Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsabläufe der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx und auf dem NextSeq 550Dx Gerät mit dem Modul DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager sequenziert. In [Variantenhäufigkeits-Korrelationsdiagramme \(Punkte sind nach eindeutiger Variante gefärbt. Varianten können in jedem einzelnen Diagramm unterschiedlich gefärbt sein.\)](#) auf Seite 62 wird die VAF-Korrelation zwischen den beiden Geräten für jede Probe dargestellt. Basierend auf der starken Korrelation zwischen dem NovaSeq 6000Dx Gerät und dem NextSeq 550Dx Gerät wurde festgelegt, dass die Leistungsmerkmale bzgl. voranalytischer Faktoren (z. B. Extraktionsmethoden oder störende Substanzen) auf beide Geräte anwendbar sind. Weitere Einzelheiten finden Sie in der Packungsbeilage von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Abbildung 15 Variantenhäufigkeits-Korrelationsdiagramme (Punkte sind nach eindeutiger Variante gefärbt. Varianten können in jedem einzelnen Diagramm unterschiedlich gefärbt sein.)



Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des NovaSeq 6000Dx Gerät wurde mit Platinum-Genom-Proben und einem repräsentativen Assay untersucht, das auf die Abfrage mit 9.232 Target-Oligos von verschiedenen Genen ausgelegt ist, die 1.970.505 Basen über 23 unterschiedliche Chromosomen hinweg abdecken. Insgesamt wurden 1.723 gezielte kleine Varianten (SNV, Insertionen und Deletionen) beurteilt. Keimbahntests bestanden aus 3 oder 4 Replikaten von 12 eindeutigen Platinum-Genom-Proben. Somatische Tests bestanden aus 5 oder 6 Replikaten von 8 eindeutigen FFPE-behandelten Platinum-Genom-Proben mit unterschiedlichen VAF-Werten. Probenbibliotheken wurden mit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien vorbereitet.

Die Tests wurden an drei externen Standorten mit jeweils einer Charge des NovaSeq 6000Dx S2-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) und des NovaSeq 6000Dx S4-Reagenzien-Kit Version 1.5 (300 Zyklen) durchgeführt. An jedem Standort wurde ein NovaSeq 6000Dx Gerät benutzt. An jedem Standort führten zwei Bediener die Tests durch. Jeder Bediener führte Tests an drei nicht aufeinanderfolgenden Starttagen für jeden Probenotyp für insgesamt 36 Durchflusszellen an den drei Standorten durch. Für jeden Starttag wurden Keimbahn-Probenbibliotheken auf Geräteseite A mit S2-Reagenzien und dem Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sequenziert; somatische Probenbibliotheken wurden auf Geräteseite B mit S4-Reagenzien und dem Somatic FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Arbeitsablauf der Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sequenziert. Diese Tests ergaben jeweils 18 Läufe für den Keimbahn- und für den somatischen Arbeitsablauf.

Germline

Bei Keimbahnläufen werden genomische Positionen, an denen eine gezielte Keimbahnvariante nachgewiesen wird, als positiv (Variante) gemeldet. Für erwartete positive Keimbahnvarianten wurden die Daten innerhalb jedes Variantentyps (SNV, Insertion, Deletion) auf die No-Call-Rate und die Rate des Prozentsatzes positiver

Calls (PPC) hin beurteilt. Unter [Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp auf Seite 63](#) werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (Lower Confidence Level, LCL/Upper Confidence Level, UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 31 Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Positive Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	991.026	0	990.276	991.026	99,92	99,92	99,93
Insertion	0	38.358	0	38.358	38.358	100	99,99	100
Deletion	0	34.758	0	32.228	34.758	92,72	92,44	92,99

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Positiver Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Genomische Positionen, an denen eine Zielvariante nicht nachgewiesen wird, werden als negativ gemeldet (Wildtyp). Für erwartete negative Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und den Prozentsatz negativer Calls (PNC) hin beurteilt. Unter [Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse auf Seite 63](#) werden die beobachteten Raten zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 32 Keimbahn-Call-Beobachtungen für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Negative Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wildtyp	0	393.516	0	393.516	393.516	100	> 99,99	100

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Negativer Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nicht nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Somatisch

Bei somatischen Läufen werden genomische Positionen, an denen eine gezielte somatische Variante nachgewiesen wird, als positiv (Variante) gemeldet. Für erwartete positive somatische Varianten, bei denen die mittlere Varianten-Allelfrequenz (VAF) größer oder gleich 14 % und kleiner oder gleich 28 % ist, wurden die Daten für die No-Call-Rate und den Prozentsatz positiver Calls (PPC) innerhalb jedes Variantentyps (SNV, Insertion, Deletion) beurteilt. Unter [Somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp \(VAF ist \$\geq 14\$ % und \$\leq 28\$ %\) auf Seite 64](#) werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 33 Somatische Präzisions-Call-Beobachtungen für erwartete positive Ergebnisse nach Variantentyp (VAF ist $\geq 14\%$ und $\leq 28\%$)

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Positive Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	71.028	0	70.314	71.028	98,99	98,92	99,07
Insertion	0	1.962	0	1.962	1.962	100	99,80	100
Deletion	0	2.142	0	2.098	2.142	97,95	97,25	98,47

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Positiver Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Genomische Positionen, an denen eine somatische Zielvariante nicht nachgewiesen wird, werden als negativ gemeldet (Wildtyp). Für erwartete negative Positionen wurden die Daten auf „No Calls“ und den Prozentsatz negativer Calls hin beurteilt. Unter [Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete negative Ergebnisse auf Seite 64](#) werden die beobachteten Raten für jeden Variantentyp zusammengefasst, zusammen mit der nach der Wilson-Methode berechneten unteren und oberen Konfidenzgrenze (LCL/UCL) für ein Konfidenzniveau von 95 %.

Tabelle 34 Beobachtungen beim Calling somatischer Varianten für erwartete negative Ergebnisse

Variantentyp	No Calls beobachtet ¹	Calls insgesamt	% No Calls	Negative Calls beobachtet ²	Beurteilte Calls insgesamt	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wildtyp	0	92.718	0	92.714	92.718	> 99,99	99,99	100

¹ No Call, definiert als gezielte chromosomale Position, an der eine Variante nicht nachgewiesen werden kann (aufgrund geringer Abdeckungstiefe).

² Negativer Call, definiert als gezielte chromosomale Positionen, an denen eine Variante nicht nachgewiesen wird.

³ Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Versionsverlauf

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200025276 Version 01	September 2022	Präzisionsdaten für Keimbahnbeobachtungen aktualisiert.
Dokument-Nr. 200025276 Version 00	August 2022	Erste Version.

Patente und Marken

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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformationen



Illumina

5200 Illumina Way

92122 San Diego, Kalifornien, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Niederlande

Australischer Sponsor

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

3000 Melbourne, VIC

Australien

Produktkennzeichnungen

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