

Ulotka dołączona do opakowania

DO CELÓW DIAGNOSTYKI IN VITRO
TYLKO NA EKSPORT

Przeznaczenie

Aparat NovaSeq 6000Dx jest przeznaczony do sekwencjonowania bibliotek DNA w oznaczeniach diagnostycznych *in vitro* (IVD). Aparat NovaSeq 6000Dx jest przeznaczony do użytku z konkretnymi zarejestrowanymi, certyfikowanymi lub zatwierdzonymi do stosowania *in vitro* odczynnikami diagnostycznymi i oprogramowaniem analitycznym.

Zasady dotyczące procedury

illumina® Aparat NovaSeq 6000Dx przeznaczony jest do sekwencjonowania bibliotek DNA przy diagnostycznych oznaczeniach *in vitro*. Funkcję danych wejściowych w przypadku aparatu NovaSeq 6000Dx pełnią biblioteki generowane z DNA, w których do amplifikowanych sekwencji docelowych dodawane są indeksy próbek i sekwencje przechwytywania. Biblioteki próbek są przechwytywane w komorze przepływowej i sekwencjonowane w aparacie przy użyciu technologii sekwencjonowania przez syntezę SBS (ang. Sequencing By Synthesis). W technologii sekwencjonowania przez syntezę stosowana jest metoda terminatora odwracalnego służąca do wykrywania znakowanych fluorescencyjnie pojedynczych nukleotydów w miarę ich wbudowywania do rosnących łańcuchów DNA. Oprogramowanie do analizy w czasie rzeczywistym (RTA) wykonuje analizę obrazów i rozpoznawanie nukleotydów oraz w każdym cyklu sekwencjonowania przypisuje wynik jakościowy do każdego nukleotydu. Po zakończeniu analizy pierwotnej można przeprowadzić analizę wtórną na nukleotydach dołączonych i wymaganych Serwer illumina DRAGEN dla NovaSeq 6000Dx do przetworzenia rozpoznań nukleotydów. Wtórna analiza w aparacie NovaSeq 6000Dx wykonywana jest przy użyciu różnych aplikacji analitycznych, w zależności od procedury. W aplikacji DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx proces przetwarzania obejmuje demultipleksowanie, tworzenie plików FASTQ, dopasowywanie, rozpoznawanie wariantów oraz tworzenie plików rozpoznawania wariantów (VCF i gVCF). Pliki VCF i gVCF zawierają informacje o wariantach linii zarodkowej lub wariantach somatycznych (w zależności od wybranej procedury) znalezionych w określonych pozycjach w genomie referencyjnym.

Dwufunkcyjny tryb pracy

NovaSeq 6000Dx zawiera pojedynczy rozruchowy dysk twardey z oddzielnym trybem diagnostyki *in vitro* (IVD) i trybem tylko do użytku badawczego (RUO). Tryb jest wybierany za pomocą przełącznika na ekranie Sequencing (Sekwencjonowanie). Wybrany tryb jest wyraźnie oznaczony w interfejsie na wszystkich ekranach. Testy sekwencjonowania IVD, w tym aplikacja DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx w przebiegu procedury linii zarodkowej i somatyczne, są wykonywane w trybie IVD. W trybie diagnostyki *in vitro* można

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

używać tylko odczynników do sekwencjonowania przeznaczonych do diagnostyki *in vitro*. Charakterystyka działania i ograniczenia procedury dla NovaSeq 6000Dx zostały ustalone przy użyciu aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx w trybie IVD.

Ograniczenia dotyczące procedury

1. Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
2. Aplikacja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, gdy jest używana z Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli) jest w stanie dostarczyć:
 - Dane wyjściowe sekwencjonowania:
 - $\geq 1,0$ terabajt (TB) z zestawem S2
 - $\geq 3,0$ TB z zestawem S4
 - Długość odczytu (w przebiegu w trybie sparowanych końców) 2×150 par nukleotydów (bp).
 - Nukleotydy wyższe niż Q30 $\geq 85\%$ przy długości odczytu 2×150 bp. 85% lub więcej rozpoznań nukleotydów ma wynik jakościowy w skali Phred powyżej 30, co oznacza rozpoznawanie nukleotydów z dokładnością powyżej 99,9%.
3. Insercje o długości > 18 bp i delecje o długości > 21 bp nie zostały zweryfikowane.
4. Duże warianty, w tym warianty wielonukleotydowe (MNV, Multi-Nucleotide Variant) i duże polimorfizmy typu indel, mogą zostać zgłoszone jako odrębne mniejsze warianty w wyjściowym pliku VCF.
5. Małe MNV są zgłaszane jako oddzielne warianty w wyjściowym pliku VCF.
6. Delecje są zgłaszane w pliku VCF we współrzędnej poprzedniego nukleotydu według formatu VCF. W związku z tym przed zgłoszeniem, że rozpoznanie danego nukleotydu jest odniesieniem homozygotycznym, należy uwzględnić sąsiednie warianty.
7. Ograniczenia swoiste dla linii zarodkowej:
 - Korzystanie NovaSeq 6000Dx z użyciem procedury analizy Germline FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ma na celu dostarczenie wyników jakościowych dla rozpoznania wariantów linii zarodkowej (np. homozygotycznych, heterozygotycznych, typu dzikiego).
 - Zmienność liczby kopii może wpływać na to, czy wariant zostanie rozpoznany jako homo- czy heterozygotyczny.
 - System nie zgłosi więcej niż dwóch wariantów w jednym locus, nawet w przypadku zmiany numeru kopii.
8. Ograniczenia swoiste dla wariantów somatycznych:
 - NovaSeq 6000Dx wykorzystujący procedury analizy Somatic FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ma na celu dostarczenie wyników jakościowych dla rozpoznania wariantów somatycznych (tj. obecności wariantu somatycznego).

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

- Procedura analizy Somatic FASTQ i VCF generation nie pozwala rozróżnić wariantów linii zarodkowej i somatycznej. Procedura ta przeznaczona jest do wykrywania wariantów o różnych częstościach wariantu, jednak częstości wariantu nie można użyć do odróżnienia wariantów somatycznych od wariantów linii zarodkowej.
- Obecność prawidłowej tkanki w próbce wpływa na wykrywanie wariantów. Zgłoszona granica wykrywalności jest oparta na częstości wariantu względem całkowitego DNA wyekstrahowanego z tkanki nowotworowej i prawidłowej.
- Jeśli w tym samym locus rozpoznany zostanie więcej niż jeden allel wariantu, żaden z alleli nie zostanie zgłoszony jako wariant przechodzący. Zamiast tego pełny zestaw alleli zostanie zgłoszony, ale będzie filtrowany za pomocą znacznika wieloalelicznego.

Procedury kontroli jakości

Oprogramowanie NovaSeq 6000Dx ocenia każdy przebieg, próbkę i rozpoznanie nukleotydu w oparciu o miary kontroli jakości. W przygotowaniu bibliotek zalecane są i powinny być oceniane kontrole dodatnie i ujemne.

Kontrole należy oceniać w następujący sposób:

- Kontrola ujemna (kontrola bez wzorca) lub inna kontrola ujemna – musi generować oczekiwany wynik. Jeśli kontrola ujemna wygeneruje wynik inny od oczekiwanego, oznacza to, że mógł wystąpić błąd w śledzeniu próbki, nieprawidłowa rejestracja starterów indeksujących, lub też doszło do zanieczyszczenia próbki.
- Dodatnia próbka kontrolna – musi generować oczekiwany wynik. Jeśli kontrola dodatnia wygeneruje wynik inny od oczekiwanego, oznacza to, że mógł wystąpić błąd w śledzeniu próbki lub rejestracja starterów indeksujących była nieprawidłowa.

Elementy produktu

Illumina NovaSeq 6000Dx składa się z następujących elementów:

1. Aparat NovaSeq 6000Dx (Nr kat. 20068232)
2. Elementy oprogramowania aparatu Aparat NovaSeq 6000Dx, w tym:

Aplikacja	Lokalizacja instalacji	Funkcja	Opis
Oprogramowanie NovaSeq Operating Software	NovaSeq 6000Dx	Sterowanie działaniem aparatu	Oprogramowanie Oprogramowanie NovaSeq Operating Software (NVOS) zarządza działaniem aparatu podczas sekwencjonowania oraz generuje obrazy używane w oprogramowaniu do analizy w czasie rzeczywistym (RTA, Real-Time Analysis).

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

Aplikacja	Lokalizacja instalacji	Funkcja	Opis
Oprogramowanie RTA (Real-Time Analysis)	NovaSeq 6000Dx	Wykonywanie analizy podstawowej	Aplikacja RTA przetwarza obrazy wygenerowane przez oprogramowanie NVOS dla poszczególnych płytek w cyklu sekwencjonowania na pliki rozpoznania nukleotydów. Podstawowe pliki rozpoznania nukleotydów stanowią dane wejściowe dla modułów aplikacji na serwerze Serwer Illumina DRAGEN dla NovaSeq 6000Dx. Aplikacja RTA nie udostępnia interfejsu użytkownika.
Illumina Run Manager (Menedżer przebiegu Illumina)	Illumina DRAGEN Server	Kontroluje konfigurację i zarządzanie przebiegami	Illumina Run Manager (Menedżer przebiegu Illumina) umożliwia zarządzanie użytkownikami i aparatem, hostuje oprogramowanie i pozwala na korzystanie z modułów analizy wtórnej genomiki akcelerowanej sprzętem DRAGEN.

Warunki pracy

Więcej informacji na temat warunków pracy znajduje się w rozdziale Kwestie środowiskowe dokumentu *Dokumentacja aparatu NovaSeq 6000Dx*.

Element	Specyfikacja
Temperatura	Utrzymywać temperaturę w laboratorium w zakresie od 19°C do 25°C (22°C ±3°C). Jest to zakres temperatury roboczej aparatu. Podczas przebiegu nie dopuszczać do zmian temperatury otoczenia większych niż ±2°C.
Wilgotność	Utrzymywać wilgotność względną bez kondensacji w zakresie 20–80%. System powinien być obsługiwany na wysokości 2000 metrów lub niższej.

Materiały eksploatacyjne i sprzęt

W tej części wymieniono wszystko, co jest potrzebne do przeprowadzenia sekwencjonowania NovaSeq 6000Dx. Obejmuje to materiały eksploatacyjne dostarczane przez Illumina oraz pomocnicze materiały eksploatacyjne i sprzęt, które należy zakupić od innych dostawców. Elementy te są wymagane do ukończenia protokołu oraz przeprowadzenia procedur konserwacji i rozwiązywania problemów.

Informacje na temat symboli na materiałach eksploatacyjnych lub opakowaniach materiałów eksploatacyjnych można znaleźć w: [Illumina IVD – legenda symboli \(dokument nr 1000000039141\)](#).

Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania

Sekwencjonowanie NovaSeq 6000Dx wymaga następujących elementów:

- Kasetę z buforem
- Kasetę klastrową
- Komorę przepływową
- Probówkę Library
- Kasetę SBS

Materiały eksploatacyjne NovaSeq 6000Dx są pakowane w następujących konfiguracjach. Każdy komponent wykorzystuje identyfikację z użyciem częstotliwości radiowych (RFID) w celu dokładnego śledzenia materiałów eksploatacyjnych i zapewnienia zgodności.

Tabela 1 Materiały eksploatacyjne dostarczane przez Illumina

Nazwa zestawu	Zawartość	Numer katalogowy Illumina
Zestaw odczytników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli)	Kaseta klastrowa S2 Komora przepływowa S2 Kaseta S2 SBS	20046931
Zestaw odczytników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli)	Kaseta klastrowa S4 Komora przepływowa S4 Kaseta S4 SBS	20046933
Kaseta z buforem NovaSeq 6000Dx S2	Kaseta z buforem S2	20062292
Kaseta z buforem NovaSeq 6000Dx S4	Kaseta z buforem S4	20062293
Probówka Library NovaSeq 6000Dx	Pojedyncza probówka Library	20062290
Probówka Library NovaSeq 6000Dx, 24 sztuki	24 probówki Library	20062291

Po otrzymaniu materiałów eksploatacyjnych należy je niezwłocznie umieścić we wskazanej temperaturze w celu zapewnienia poprawnego działania.

Tabela 2 Przechowywanie zestawów NovaSeq 6000Dx

Materiał eksploatacyjny	Ilość	Temperatura przechowywania	Długość	Szerokość	Wysokość
Komora przepływowa	1	Od 2°C do 8°C	27,7 cm (10,9 cala)	17 cm (6,7 cala)	3,8 cm (1,5 cala)
Kaseta klastrowa	1	Od -25°C do -15°C	29,5 cm (11,6 cala)	13 cm (5,1 cala)	9,4 cm (3,7 cala)



Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Materiał eksploatacyjny	Ilość	Temperatura przechowywania	Długość	Szerokość	Wysokość
Kaseta SBS	1	Od -25°C do -15°C	30 cm (11,8 cala)	12,4 cm (4,9 cala)	11,2 cm (4,4 cala)
Kaseta z buforem	1	Od 15°C do 30°C	42,2 cm (16,6 cala)	20,6 cm (8,1 cala)	21,1 cm (8,3 cala)
Probówka Library	1	Od 15°C do 30°C	4,1 cm (1,6 cala)	2,3 cm(0,9 cala)	12,4 cm (4,9 cala)

Szczegóły dotyczące materiałów eksploatacyjnych

W celu identyfikacji kompatybilnych elementów zestawu, komory przepływowe i kasety są oznaczone symbolami wskazującymi tryb działania zestawu.

Tabela 3 Oznakowanie wskazujące zgodność

Tryb zestawu	Oznaczenia na etykiecie	Opis
Elementy zestawu S2		Komora przepływowa S2 generuje do 4,1 miliarda pojedynczych odczytów przechodzących przez filtr, z wydajnością do 1000 Gb przy 2 x 150 bp. Komora przepływowa S2 zapewnia szybkie sekwencjonowanie dla większości zastosowań o wysokiej przepustowości.
Elementy zestawu S4		Komora przepływowa S4 generuje do 10 miliardów pojedynczych odczytów przechodzących przez filtr, z wydajnością do 3000 Gb przy 2 x 150 bp. Komora przepływowa S4 jest czteropasmową wersją komory przepływowej, zaprojektowaną z myślą o maksymalnej wydajności.

Komora przepływowa

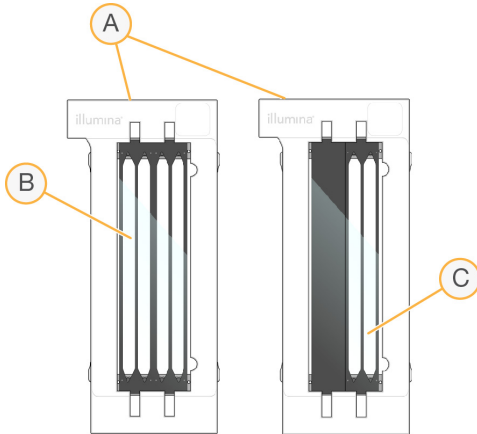
Komora przepływowa NovaSeq 6000Dx to komora przepływowa według wzorca, zamknięta w kasecie. Komora przepływowa jest substratem na bazie szkła zawierającym miliardy nanodołków w uporządkowanym układzie. W nanodołkach tworzą się klastry, z poziomu których jest następnie przeprowadzane sekwencjonowanie.

Każda komora przepływowa ma wiele pasm do sekwencjonowania pulowanych bibliotek. Komora przepływowa S2 ma dwa pasma, a komora przepływu S4 – cztery. Każde pasmo jest obrazowane w wielu zbiorach, a oprogramowanie dzieli następnie obraz każdego zbioru na mniejsze części zwane płytkami.

Niewielkie zarysowania i inne drobne wady kosmetyczne komory przepływowej są normalne i nie powinny pogarszać jakości i wydajności danych. Illumina zaleca normalne używanie tych komór przepływowych.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 1 Komory przepływowe



- A. Kasetę komory przepływowej
- B. Czteropasmowa komora przepływowa (S4)
- C. Dwupasmowa komora przepływowa (S2)

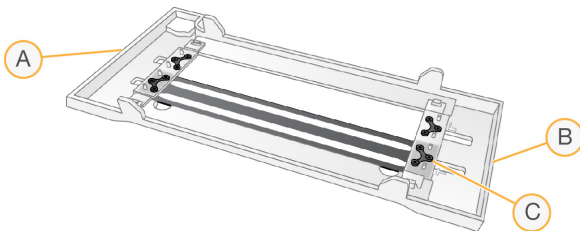
Spodnia część każdej komory przepływowej jest wyposażona w wiele uszczelek. Biblioteki i odczynniki przedostają się do pasm komory przepływowej przez uszczelki na końcu wlotowym komory przepływowej. Zużyte odczynniki są usuwane z pasm przez uszczelki na końcu wylotowym.



PRZESTROGA

Należy unikać dotykania uszczelek podczas pracy z komorą przepływową.

Rysunek 2 Odwrócona komora przepływowa



- A. Koniec wylotowy
- B. Koniec wlotowy
- C. Uszczelka (jedna z czterech)




Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Szczegóły dotyczące kaset z buforem, klastrowej i SBS

Kasety NovaSeq 6000Dx: z buforem, klastrowe i SDS zawierają zabezpieczone folią zbiorniczki wstępnie wypełnione odczynnikami, buforami i roztworem płuczącym. Kasety klastrowe i SBS są dołączone do zestawów odczynników NovaSeq 6000Dx. Kasetka z buforem jest sprzedawana oddzielnie.

Kasety są ładowane bezpośrednio do aparatu i są oznaczone kolorami oraz etykietami w celu zmniejszenia liczby błędów podczas ładowania. Prowadnice w szufladach chłodziarki odczynników i bufora zapewniają prawidłową orientację.

Tabela 4 Kasety NovaSeq 6000Dx

Material eksploatacyjny	Opis
 Kaseta z buforem	<p>Wstępnie napełniona buforami sekwencjonującymi, waży do 6,8 kg (15 lb). Plastikowy uchwyt ułatwia przenoszenie, ładowanie i rozładowywanie.</p> <p>Kaseta z buforem zawiera odczynniki wrażliwe na światło. Pojemnik z buforem należy przechowywać w opakowaniu do momentu użycia.</p>
 Kaseta klastrowa	<p>Wstępnie napełniona odczynnikami klastrującymi, indeksującymi oraz odczynnikami do sparowanych końców i roztworem płuczącym. Zawiera wyznaczoną pozycję dla próbki Library. Pomarańczowe oznaczenia odróżniają kasetę klastrową od kasety SBS.</p> <p>Odczynnik denaturacyjny w pozycji nr 30 zawiera formamid, który jest organicznym amidem i działa szkodliwie na rozrodczość. W celu ułatwienia bezpiecznej utylizacji odczynnika nieużytego po przebiegu sekwencjonowania ten zbiorniczek można wyjmować.</p>
 Kaseta SBS	<p>Wstępnie napełniona odczynnikami sekwencjonującymi w objętościach specyficznych dla liczby cykli obsługiwanych przez zestaw. Każda z trzech pozycji odczynnika ma sąsiadującą pozycję, zarezerwowaną dla automatycznego płukania po przebiegu. Szare oznaczenia odróżniają kasetę SBS od kasety klastrowej.</p> <p>Kaseta SBS zawiera odczynniki wrażliwe na światło. Pojemnik SBS należy przechowywać w opakowaniu do momentu użycia.</p>

Zarezerwowane zbiorniczki kasety klastrowej

Trzy zbiorniczki są zarezerwowane dla niestandardowych starterów, a pusta pozycja jest zarezerwowana dla próbki Library. W celu śledzenia próbek próbka Library jest ładowana do kasety klastrowej podczas konfiguracji przebiegu i pozostaje w kasecie do końca przebiegu.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 3 Ponumerowane zbiorniczki

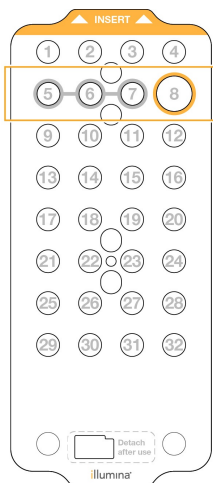


Tabela 5 Zbiorniczki kasety klastrowej

Pozycja	Zarezerwowana dla
5, 6 i 7	Opcjonalne startery niestandardowe
8	Probówka Library

Materiały eksploatacyjne i wyposażenie dostarczane przez użytkownika

Tabela 6 Materiały eksploatacyjne

Materiał eksploatacyjny	Dostawca	Cel
Butelka do wirówki, 500 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny	Tween 20 do rozcieńczania, do płukania konserwacyjnego.
Probówka do wirówki, 30 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny	NaOCl do rozcieńczania, do płukania konserwacyjnego.
Rękawiczki jednorazowe, bezpydrowe	Ogólny dostawca laboratoryjny	Ogólne przeznaczenie.
Chusteczki nasączone 70% alkoholem izopropylowym lub Chusteczki nasączone alkoholem etylowym, 70%	VWR, nr kat. 95041-714 (lub równoważne) Ogólny dostawca laboratoryjny	Czyszczenie elementów przed przebiegiem i zastosowania ogólne.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Materiał eksploatacyjny	Dostawca	Cel
Chusteczki laboratoryjne, niestrzępiące się	VWR, nr kat. 21905-026 (lub równoważne)	Osuszanie platformy komory przepływowej i zastosowania ogólne.
NaOCl, klasa odczynnikowa, 5%	Sigma-Aldrich, nr kat. 239305	Przeprowadzanie płukania konserwacyjnego.
Końcówki do pipet, 2 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Pipetowanie w celu rozcieńczenia i ładowanie bibliotek.
Końcówki do pipet, 20 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Pipetowanie w celu rozcieńczenia i ładowanie bibliotek.
Końcówki do pipet, 200 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Pipetowanie w celu rozcieńczenia i ładowanie bibliotek.
Końcówki do pipet, 1000 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Pipetowanie w celu rozcieńczenia i ładowanie bibliotek.
Alkohol izopropylowy klasy odczynnikowej lub spektrofotometrycznej (99%), butelka 100 ml	Ogólny dostawca laboratoryjny	Okresowe czyszczenie elementów optycznych i pomocniczo do kasety do czyszczenia obiektywu.
Tween 20	Sigma-Aldrich, nr kat. P7949	Przeprowadzanie płukania konserwacyjnego.
Woda, jakość laboratoryjna	Ogólny dostawca laboratoryjny	Tween 20 i podchloryn sodu do rozcieńczania, do płukania konserwacyjnego

Tabela 7 Wyposażenie

Element	Źródło
Zamrażarka, od -25°C do -15°C	Ogólny dostawca laboratoryjny
Cylinder z podziałką, 500 ml, sterylne	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pojemnik na lód	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipeta, 20 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipeta, 200 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Pipeta, 1000 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny
Chłodziarka, od 2°C do 8°C	Ogólny dostawca laboratoryjny
Zbiornik, kąpiele wodne*	Ogólny dostawca laboratoryjny

* Należy użyć zbiornika, który może pomieścić dwie kasetki odczynników i zapewnić odpowiedni poziom wody. Na przykład: (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm)(24 cale × 36 cali × 10 cali).

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Wytyczne dotyczące wody laboratoryjnej

Do przeprowadzania procedur w aparacie zawsze należy używać wody laboratoryjnej lub wody dejonizowanej. Nie wolno używać wody z kranu. Należy używać wyłącznie następujących rodzajów wody lub jej odpowiedników:

- Woda dejonizowana
- Illumina PW1
- Woda o rezystywności 18 megaomów (MΩ)
- Woda Milli-Q
- Woda Super-Q
- Woda do zastosowań w biologii molekularnej

Instrukcja użytkowania

Poniższe instrukcje dotyczą uruchamiania Aparat NovaSeq 6000Dx w trybie IVD przy użyciu konfiguracji zestawu S2 lub S4.

Tworzenie przebiegu sekwencjonowania

Aby utworzyć przebieg przy użyciu Illumina Run Manager (Menedżer przebiegu Illumina) w trybie IVD lub RUO, należy wykonać następujące czynności. Można również wybrać opcję **Import Run** (Importuj przebieg) na karcie Planned (Zaplanowane) na stronie Runs (Przebiegi) i zaimportować arkusz próbek. Utworzyć nowy przebieg w aparacie lub poprzez uzyskanie dostępu do Illumina Run Manager (Menedżer przebiegu Illumina) za pomocą przeglądarki na komputerze podłączonym do sieci.

UWAGA Dokładne informacje wymagane przez każdą aplikację do analizy różnią się, lecz proces tworzenia przebiegu obejmuje następujące kroki.

1. Na karcie Planned (Zaplanowane) na ekranie Runs (Przebiegi) wybrać polecenie **Create Run** (Utwórz przebieg).
2. Wybrać aplikację, a następnie kliknąć przycisk **Next** (Dalej).
3. Przejść przez ekrany ustawień. W zależności od zastosowania wyświetlane ekrany mogą obejmować następujące elementy:
 - **Run Settings** (Ustawienia przebiegu) – umożliwi wprowadzenie parametrów przebiegu.
 - **Sample Data** (Dane próbki) – umożliwi wprowadzenie danych próbki ręcznie lub poprzez import pliku CSV zawierającego informacje o próbce. Nazwy próbek muszą być unikatowe.
 - **Analysis settings** (Ustawienia analizy) – wprowadzić ustawienia do analizy.
4. Na ekranie Review (Przejrzyj) przejrzeć informacje o przebiegu i wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Przebieg zostanie dodany do górnej części listy przebiegów na karcie Planned (Zaplanowane).

Przygotowanie materiałów eksploatacyjnych

Rozmrażanie kaset SBS i klastrowych

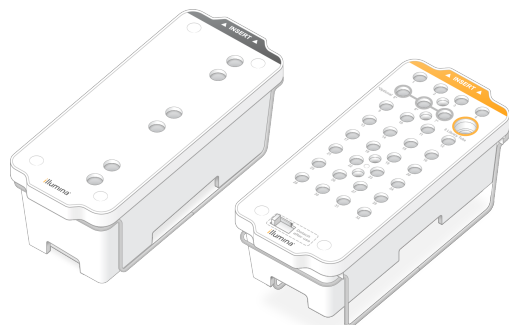


PRZESTROGA

Używanie gorącej wody do rozmrażania odczynników może spowodować pogorszenie jakości danych lub niepowodzenie przebiegu.

1. Jeśli trwa sekwencjonowanie, po zakończeniu rozmrażania należy upewnić się, że obie strony aparatu są dostępne.
2. Wyjąć kasety SBS i klastrową z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C .
3. Umieścić każdą kasetę w drucianym stojaku do rozmrażania. Stojaki są dostarczane z urządzeniem i zapobiegają przewracaniu się w kąpielii wodnej.

Rysunek 4 Kasety w drucianym stojaku do rozmrażania



4. Użyć poniższej tabeli, aby określić czas rozmrażania. Rozmrozić kasety SBS i klastrowe w kąpielii wodnej o temperaturze pokojowej (od 19°C do 25°C) w następujący sposób. Zanurzyć kasety mniej więcej do połowy.

Kaseta	Czas trwania rozmrażania
Kaseta S2 SBS	4 godziny
Kaseta klastrowa S2	Do 2 godzin
Kaseta S4 SBS	4 godziny
Kaseta klastrowa S4	Do 4 godzin



PRZESTROGA

Nierozpoczęcie sekwencjonowania w ciągu czterech godzin od rozmrożenia kaset odczynników może spowodować pogorszenie jakości danych.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

5. Dokładnie osuszyć podstawy kaset ręcznikami papierowymi. Osuszyć między dołkami, aby usunąć całą wodę.
6. Sprawdzić foliowe zamknięcia pod kątem obecności wody. W przypadku obecności wody osuszyć niestrzępiącą się chusteczką.
7. Sprawdzić spód każdej kasety, aby upewnić się, że zbiorniczki są wolne od lodu, co oznacza, że odczynniki zostały rozmrożone.
8. Wymieszać odczynniki, odwracając każdą kasetę 10 razy.



PRZESTROGA

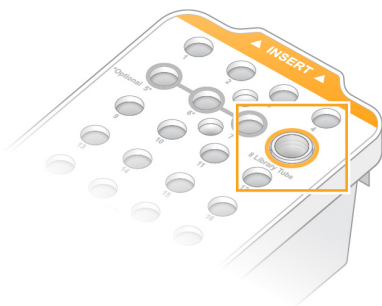
Niewykonanie starannego odwrócenia kaset może spowodować pogorszenie jakości danych.

9. Delikatnie postukać spodem każdej kasety o blat w celu zmniejszenia liczby pęcherzyków powietrza.

Ładowanie probówki Library

1. Bez poruszania biblioteki w dolnej części, włożyć niezamkniętą probówkę Library, zawierającą denaturowaną i rozcieńczoną pulę biblioteki w pozycji **Library Tube** (nr 8) kasety klastrowej.
2. Włożyć probówkę Library w pozycji nr 8 kasety klastrowej.

Rysunek 5 Niezamknięta probówka Library załadowana w pozycji nr 8



Opróżnianie butelek na zużyte odczynniki

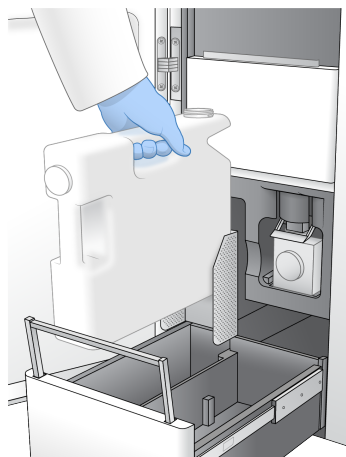
W przypadku *każdego* sekwencjonowania należy postępować zgodnie z poniższymi instrukcjami w celu opróżnienia butelek na zużyte odczynniki. Jeśli system jest skonfigurowany do wyprowadzania używanych odczynników na zewnątrz, mała butelka zbiera zużyte odczynniki i musi zostać opróżniona w przypadku każdego przebiegu sekwencjonowania. Duża butelka musi znajdować się na miejscu.

1. Wyjąć i opróżnić małą butelkę na zużyte odczynniki w następujący sposób.
 - a. Podnieść dźwignię i wyjąć małą butelkę na zużyte odczynniki z wnęki. Chwycić butelkę po bokach.
 - b. Zdjąć gwintowaną zatyczkę z uchwyty zatyczki z przodu butelki.
 - c. Zamknąć otwór butelki zatyczką, aby zapobiec rozlaniu.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

- d. Zawartość należy przechowywać oddzielnie od zawartości drugiej butelki; utylizować zgodnie z odpowiednimi standardami obowiązującymi w danym regionie.
 - e. Umieścić butelkę bez zatyczki we wnęce, a następnie opuścić dźwignię. Przechowywać zatyczkę w uchwycie zatyczki.
2. Wyjąć i opróżnić dużą butelkę na zużyte odczynniki w następujący sposób.
- a. Za pomocą górnego uchwytu wyjąć dużą butelkę na zużyte odczynniki z lewej strony szuflady bufora.
 - b. Zdjąć gwintowaną zatyczkę z uchwytu zatyczki z przodu butelki.
 - c. Zamknąć otwór butelki zatyczką, aby zapobiec rozlaniu.
 - d. Zawartość należy utylizować zgodnie z odpowiednimi standardami obowiązującymi w danym regionie. Podczas opróżniania chwycić oba uchwyty.
 - e. Umieścić butelkę bez zatyczki w szufladzie bufora. Przechowywać zatyczkę w uchwycie zatyczki.

Rysunek 6 Zwrot pustej butelki



3. Założyć nowe rękawiczki bezpudrowe.



PRZESTROGA

Po kontakcie z butelką na zużyte odczynniki należy zawsze założyć nową parę rękawiczek.

4. Zamknąć szufladę bufora, a następnie drzwi przedziału płynów.



PRZESTROGA

Nieopróżnienie butelek na zużyte odczynniki może spowodować przerwanie przebiegu i przepełnienie, co spowoduje uszkodzenie aparatu i zagrożenie dla bezpieczeństwa.

Przygotowywanie komory przepływowej

1. Wyjąć nową, zapakowaną komorę przepływową z miejsca przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

2. Odłożyć zamkniętą komorę na bok w temperaturze otoczenia (19°C do 25°C) na 10–15 minut. Komorę przepływową należy wykorzystać w ciągu 12 godzin od wyjęcia z opakowania.

Ładowanie materiałów eksploatacyjnych

Aby rozpocząć konfigurację przebiegu i załadować materiały eksploatacyjne, należy postępować zgodnie z poniższymi instrukcjami.

1. W menu głównym wybrać **Sequence** (Sekwencjonowanie), a następnie wybrać przebieg z pojedynczą lub podwójną komorą przepływową, w następujący sposób.
 - **A+B** – konfiguracja przebiegu z podwójną komorą przepływową
 - **A** – konfiguracja przebiegu z pojedynczą komorą przepływową po stronie A
 - **B** – konfiguracja przebiegu z pojedynczą komorą przepływową po stronie BSystem rozpoczyna konfigurację przebiegu, zaczynając od załadowania komory przepływowej.
2. Wybrać **OK**, aby zatwierdzić ostrzeżenie i otworzyć drzwiczki komory przepływowej.



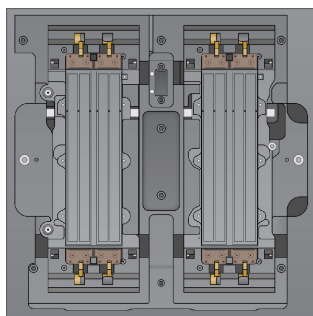
PRZESTROGA

Podczas sekwencjonowania powierzchnia powinna być czysta, należy także unikać opierania się o aparat. Nacisk na drzwiczki komory przepływowej może spowodować jej otwarcie, co zatrzyma przebieg. Zatrzymanych przebiegów nie można wznowić.

Ładowanie komory przepływowej

1. Usunąć komorę przepływową z poprzedniego przebiegu, jeśli jest obecna.
2. Jeśli na platformie komory przepływowej widoczne są cząstki stałe, należy wyczyścić całą platformę, w tym interfejs płynowy i szklaną powierzchnię celu dopasowania optycznego, za pomocą wacika nasączonego alkoholem. Osuszyć niestrzępiącą się chusteczką.

Rysunek 7 Stolik na komorę przepływową

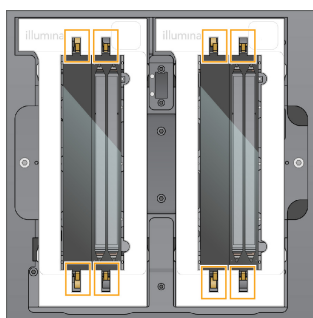


3. Wyjąć komorę przepływową z opakowania w następujący sposób.
 - a. Założyć nową parę bezpudrowych rękawiczek, aby uniknąć zanieczyszczenia szklanej powierzchni komory przepływowej.
 - b. Umieścić opakowanie na płaskiej powierzchni i oderwać folię z narożnej wypustki.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

- c. Zdjąć przezroczyste plastikowe przykrycie komory przepływowej.
 - d. Wyjąć komorę przepływową z opakowania. Chwycić komorę przepływową za boki, aby uniknąć dotykania szkła lub uszczelek dolnych.
 - e. Jeśli na którejkolwiek ze szklanych powierzchni widoczne są cząstki stałe, należy wyczyścić odpowiednią powierzchnię niestrzępiącą się chusteczką nasączoną alkoholem i osuszyć niestrzępiącą się chusteczką laboratoryjną.
 - f. Wyrzucić opakowanie w odpowiedni sposób.
4. Wyrównać komorę przepływową względem czterech wystających zacisków i umieścić ją na platformie komory przepływowej.

Rysunek 8 Załadowane komory przepływowe wyrównane na zaciskach



5. Wybrać opcję **Close Flow Cell Door** (Zamknij drzwiczki komory przepływowej).
Drzwiczki komory przepływowej zamkną się, zostaną sprawdzone czujniki oraz RFID, a na ekranie pojawi się identyfikator komory przepływowej.

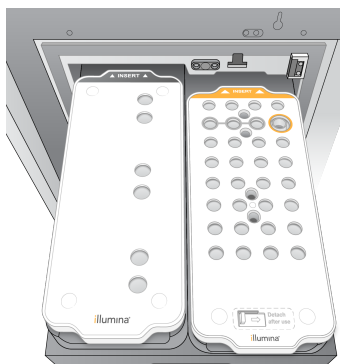
Ładowanie kaset SBS i klastrowych

1. Otworzyć drzwiczki przedziału płynów, a następnie otworzyć drzwiczki chłodziarki odczynników.
2. Usunąć zużyte kasety SBS i klastrowe z poprzedniego przebiegu, jeśli są obecne.
Zużyte kasety mają przebite foliowe zamknięcia.
3. Zutylizować nieużytą zawartość zgodnie z właściwymi normami.
Informacje na temat bezpiecznej utylizacji pozycji nr 30 kasety klastrowej można znaleźć w punkcie [Odlączenie pozycji nr 30 na stronie 21](#).

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

4. Umieścić przygotowane wkłady w szufladzie chłodziarki odczynników w następujący sposób, tak aby etykiety Insert (Włóż) były skierowane w stronę tylnej części aparatu.
 - Umieścić kasetę SBS (szara etykieta) w lewej pozycji.
 - Umieścić kasetę klastrową (pomarańczowa etykieta) zawierającą niezamkniętą probówkę biblioteki w odpowiednim położeniu.

Rysunek 9 Ładowanie kaset odczynników



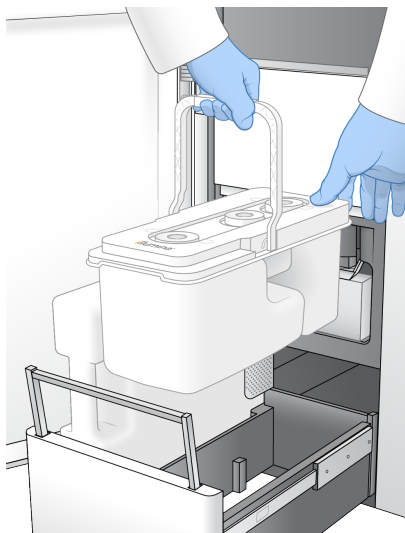
5. Wsunąć tacę do chłodziarki, a następnie zamknąć drzwiczki chłodziarki odczynników. Czujniki i RFID są sprawdzane. Na ekranie zostaną wyświetlone identyfikatory probówki Library i dwóch kaset.

Ładowanie kasety z buforem

1. Pociągnąć metalowy uchwyt, aby otworzyć szufladę bufora.
2. Wyjąć zużytą kasetę z buforem z prawej strony szuflady bufora. Zużyta kasetka z buforem ma przebite foliowe zamknięcia.
3. Umieścić nową kasetę z buforem w szufladzie bufora w taki sposób, aby etykieta Illumina była skierowana w stronę przedniej części szuflady. Wyrównać kasetę z wypukłymi prowadnicami na dnie i bokach szuflady. Po prawidłowym załadowaniu kasetka z buforem jest równomiernie osadzona i szuflada może się zamknąć.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 10 Ładowanie kasety z buforem



4. Jeśli obydwie butelki na zużyte odczynniki zostały opróżnione, zaznaczyć pole wyboru, potwierdzając, że obie butelki na zużyte odczynniki są puste.

UWAGA Nieopróżnienie butelek na zużyte odczynniki może spowodować przerwanie przebiegu i przepełnienie, co spowoduje uszkodzenie aparatu i zagrożenie dla bezpieczeństwa.

5. Po dodaniu materiałów eksploatacyjnych wybrać opcję **Run Selection** (Wybór przebiegu), aby kontynuować.

Wybieranie i rozpoczynanie przebiegu

Aparat skanuje identyfikator próbówki Library i wyszukuje zgodny zaplanowany przebieg.

1. Jeśli dla każdej używanej strony zostanie zaplanowany przebieg zgodny z identyfikatorem próbówki Library, wybór przebiegu zostanie pominięty. Wybrać opcję **Review** (Przejrzyj), aby kontynuować.
2. Jeśli nie ma zgodnego przebiegu dla jednej lub obu stron, wybrać opcję **Run Selection** (Wybór przebiegu), a następnie wybrać co najmniej jeden zaplanowany przebieg.
Nie można wybrać tego samego zaplanowanego przebiegu po obu stronach.
3. Po wybraniu co najmniej jednego przebiegu wybrać opcję **Pre-Run Checks** (Kontrole przed przebiegiem).
4. Odczekać około 5 minut na zakończenie kontroli przed przebiegiem.
Przebieg rozpocznie się automatycznie po ich pomyślnym zakończeniu.

UWAGA Aby uniknąć przepełnienia dysku twardego, nie należy kopiować żadnych danych na dysk C:\ po rozpoczęciu przebiegu.

Błędy wstępnego testu kontrolnego

1. Jeśli kontrole przed przebiegiem nie powiedzą się z powodu błędu czujnika, takiego jak niewykrucie komory przepływowej, należy zamknąć i ponownie uruchomić procedurę.
2. W przypadku niepowodzenia innych kontroli przed przebiegiem wybrać opcję **Retry** (Ponów), aby ponownie uruchomić nieudaną kontrolę, lub opcję **Retry All** (Ponów wszystkie), aby ponownie uruchomić wszystkie kontrole.
Błędy należy usunąć przed rozpoczęciem przebiegu.
3. Wybrać ikonę **Error** (Błąd), aby wyświetlić szczegóły błędu.
4. Jeśli kontrola wyrównania nie powiedzie się, należy usunąć błąd w następujący sposób.
 - a. Wybrać opcję **Reload** (Załaduj ponownie), a następnie wybrać opcję **OK**, aby powrócić do ekranu Load (Załaduj).
 - b. Usunąć wszystkie elementy z górnej części aparatu, a następnie wybrać opcję **OK**. Drzwiczki komory przepływowej się otworzą.
 - c. Załadować ponownie komorę przepływową, a następnie wybrać opcję **Run Setup** (Konfiguracja przebiegu).
 - d. Przejść przez każdy ekran, aby ponownie odczytać każdy znacznik RFID i powrócić do ekranu Pre-Run Checks (Kontrole przed przebiegiem).
 - e. Ponownie wykonać kontrolę.

Kontrola postępu przebiegu

Podczas przebiegu na ekranie Sequencing (Sekwencjonowanie) wyświetlane są następujące szczegóły. Dostęp do ekranu Sequencing (Sekwencjonowanie) można uzyskać z menu głównego.






- **Status poszczególnych etapów przebiegu**
- **Time to completion** (Czas do ukończenia) – data i godzina ukończenia przebiegu (rrrr-mm-dd gg:mm).
- **Run progress** (Postęp przebiegu) – bieżący etap przebiegu. Rozmiar paska postępu nie jest proporcjonalny do stopnia przebiegu poszczególnych kroków.
- **Q-Score** (Wynik jakościowy) – pokazuje rozkład wyników jakościowych.
- **Intensity** (Intensywność) – pokazuje wartość intensywności klastrów 90. percentyla dla każdej płytki. Kolory wykresu wskazują czerwone i zielone kanały.
- **Clusters Passing Filter (%)** (Klastry przechodzące przez filtr (%)) – pokazuje odsetek klastrów przechodzących przez filtr.
- **Projected Total Yield (GB)** (Przewidywana całkowita wydajność (GB)) – prognozowana wydajność dla przebiegu komory przepływowej. Jeśli wybrano parametry w paśmie (H), wyświetlane liczby stanowią bieżącą wydajność w paśmie i są aktualizowane dla każdego cyklu w trakcie przebiegu.
- **Q30** – odsetek podstawowych rozpoznań dla przebiegu, którego wynik jakościowy wynosi ≥ 30 .

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Ikony statusu

Ikona statusu w interfejsie oprogramowania NVOS wskazuje status przebiegu. Liczba na ikonie wskazuje liczbę stanów dla statusu.

Po zmianie statusu przebiegu ikona miga. Aby wyświetlić opis stanu, należy wybrać daną ikonę. Należy wybrać opcję **Acknowledge** (Zatwierdź), aby usunąć komunikat, a następnie wybrać opcję **Close** (Zamknij), aby zamknąć okno dialogowe.

Ikona statusu	Nazwa statusu	Opis
	Status OK	System działa prawidłowo.
	Przetwarzanie	System jest w trakcie przetwarzania.
	Ostrzeżenie	Wygenerowano ostrzeżenie i wymagane jest zachowanie ostrożności. Ostrzeżenia nie zatrzymują przebiegu ani nie wymagają podjęcia działania przed kontynuowaniem przebiegu.
	Błąd	Wystąpił błąd. Błędy wymagają podjęcia działania przed kontynuowaniem przebiegu.
	Informacje	Dostępny jest komunikat niekrytyczny.

Pomiary przebiegu

Oprogramowanie wyświetla wskaźniki pomiarowe wygenerowane podczas przebiegu. Wskaźniki pomiarowe są wyświetlane w postaci wykresów, grafik i tabel na podstawie danych wygenerowanych przez urządzenie RTA3 i zapisanych w plikach InterOp.

Klastrowanie trwa około 2 godzin, a następnie sekwencjonowanie rozpoczyna się od cyklu 1. Wskaźniki są aktualizowane w miarę postępu sekwencjonowania. Dane dotyczące klastrów przechodzących przez filtr, wydajności i jakości są dostępne po cyklu 26. Przed cyklem 26 żadne wartości nie są podawane i są one oznaczone jako not applicable (nie dotyczy).

Po sekwencjonowaniu

W poniższych częściach znajdują się instrukcje dotyczące etapów, które mają miejsce po zakończeniu sekwencjonowania.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Automatyczne płukanie po przebiegu

Po zakończeniu sekwencjonowania oprogramowanie rozpoczyna automatyczne płukanie po przebiegu, które trwa około 80 minut. System pompuje 0,24% podchloryn sodu (NaOCl) z pozycji nr 17 i rozcieńcza go do 0,12%. Roztwór 0,12% NaOCl jest pompowany do pozycji odczynnika ExAmp i biblioteki przez komorę przepływową, a następnie do butelek na zużyte odczynniki. Płukanie wymywa wzorzec z systemu, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.

Po zakończeniu płukania system przechodzi w stan bezpieczny, a przycisk Home staje się aktywny. Pozostawić materiały eksploatacyjne na miejscu do następnego przebiegu. Po płukaniu dozowniki pozostają w kasetach SBS i klastrowych, aby zapobiec przedostawaniu się powietrza do systemu. Dozowniki w kasecie z buforem są podnoszone w celu opróżnienia butelek na zużyte odczynniki. Następnie bufor płuczący jest przepompowywany przez wszystkie linie w celu usunięcia NaOCl i odczynników z systemu.

UWAGA Jeśli podczas automatycznego płukania po przebiegu wystąpi błąd, a płukanie po przebiegu nie będzie kompletne, konieczne jest przeprowadzenie płukania konserwacyjnego.

Odłączanie pozycji nr 30

Zbiorniczek w pozycji nr 30 kasety klastrowej zawiera formamid. Jest on usuwany ze zużytej kasety klastrowej i wyrzucany oddzielnie.



PRZESTROGA

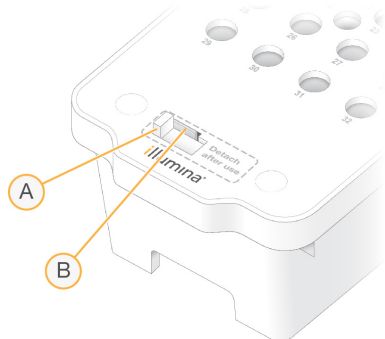
Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

1. Dłońmi w rękawiczkach popchnąć białą plastikową wypustkę oznaczoną **Detach after use** (Odłącz po zużyciu) w prawo.
2. Umieścić dłoń lub stałą powierzchnię pod zbiorniczkiem i nacisnąć przezroczystą plastikową wypustkę w kierunku etykiety Illumina spod kasety klastrowej.

UWAGA Unikać układania kaset klastrowych w stos podczas przechowywania. Układanie w stos może spowodować przypadkowe odłączenie zbiorniczka.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 11 Wyjmowana pozycja nr 30



- A. Biała plastikowa wypustka do odłączania
- B. Przezroczysta plastikowa wypustka do zwalniania

3. Zutylizować zbiorniczek zgodnie z obowiązującymi normami.

Dane wyjściowe sekwencjonowania

Podczas sekwencjonowania dane są automatycznie przesyłane z Aparat NovaSeq 6000Dx do Illumina DRAGEN Server. Po zakończeniu analizy pierwotnej i przeniesieniu danych analiza wtórna na serwerze Illumina DRAGEN Server może rozpocząć się automatycznie, korzystając z opcji analizy zdefiniowanych przez aplikację wybraną w Illumina Run Manager (Menedżer przebiegu Illumina). Uzyskane wyniki zależą od opcji wybranych podczas konfiguracji przebiegu. Aby wyświetlić wyniki z przebiegu, należy wybrać żądaną nazwę przebiegu na karcie Completed (Zakończone) na ekranie Runs (Przebiegi). Pliki wyjściowe można również znaleźć w lokalizacji określonej na ekranie Instrument Settings (Ustawienia aparatu).

Oprogramowanie Real-Time Analysis

Aparat NovaSeq 6000Dx uruchamia RTA3, implementację oprogramowania Oprogramowanie Real-Time Analysis, z wykorzystaniem silnika Compute Engine (CE) aparatu. Oprogramowanie RTA3 wyodrębnia intensywności z obrazów otrzymanych z kamery, przeprowadza rozpoznanie nukleotydów, przypisuje wynik jakościowy do rozpoznań nukleotydów, dopasowuje do PhiX i raportuje dane w plikach InterOp.

W celu optymalizacji czasu przetwarzania oprogramowanie RTA3 zapisuje informacje w pamięci. W przypadku przerwania pracy oprogramowania RTA3 przetwarzanie nie jest wznawiane, a dane każdego przebiegu przetwarzane w pamięci zostają utracone.

Dane wejściowe w oprogramowaniu RTA3

Oprogramowanie RTA3 wymaga obrazów płytek zawartych w pamięci lokalnego systemu na potrzeby przetwarzania. RTA3 otrzymuje informacje o uruchomieniu i polecenia z NVOS.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Dane wyjściowe w oprogramowaniu RTA3

Obrazy poszczególnych kanałów kodowanych kolorem są przekazywane w pamięci do oprogramowania RTA3 jako płytki. Na podstawie tych obrazów oprogramowanie RTA3 generuje zestaw plików rozpoznania nukleotydów z oceną jakościową oraz plików filtrów. Wszystkie pozostałe dane wyjściowe są pomocniczymi plikami wyjściowymi.

Typ pliku	Opis
Pliki rozpoznania nukleotydów	Każda przeanalizowana płytka jest uwzględniana w skoncatenowanym pliku rozpoznania nukleotydów (*.cbcl). Płytki z tego samego pasma i powierzchni są umieszczane zbiorczo w jednym pliku CBCL dla danego pasma i powierzchni.
Pliki filtrów	Każda płytka generuje plik filtru (*.filter), który określa, czy klaster przechodzi przez filtry.

Oprogramowanie RTA3 zapewnia parametry w czasie rzeczywistym dotyczące jakości przebiegu zapisywane jako pliki InterOp, które są binarnymi danymi wyjściowymi zawierającymi informacje o płytkach, cyklu i parametrach w czasie rzeczywistym.

Usuwanie błędów

Oprogramowanie RTA3 tworzy pliki dziennika i zapisuje je w folderze Logs. Błędy są zapisywane w pliku tekstowym w formacie *.log.

Następujące pliki dzienników są przesyłane do końcowej lokalizacji danych wyjściowych pod koniec przetwarzania:

- `info_00000.log` – zawiera podsumowanie zdarzeń ważnych dla przebiegu.
- `error_00000.log` – zawiera listę błędów, jakie wystąpiły podczas przebiegu.
- `warning_00000.log` – zawiera listę ostrzeżeń, jakie wystąpiły podczas przebiegu.

Płytki komory przepływowej

Płytki są niewielkimi obszarami obrazowania w komorze przepływowej. Kamera wykonuje jedno zdjęcie każdego zbioru, które oprogramowanie dzieli na płytki do przetwarzania RTA3. Łączna liczba płytek zależy od liczby pasm, zbiorów i powierzchni obrazowanych w komorze przepływowej.

- Komory przepływowe S2 mają łącznie 1408 płytek.
- Komory przepływowe S4 mają łącznie 3744 płytki.

Element komory przepływowej	S2	S4	Opis
Pasma	2	4	Pasma jest kanałem fizycznym z portami wejściowym i wyjściowym.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

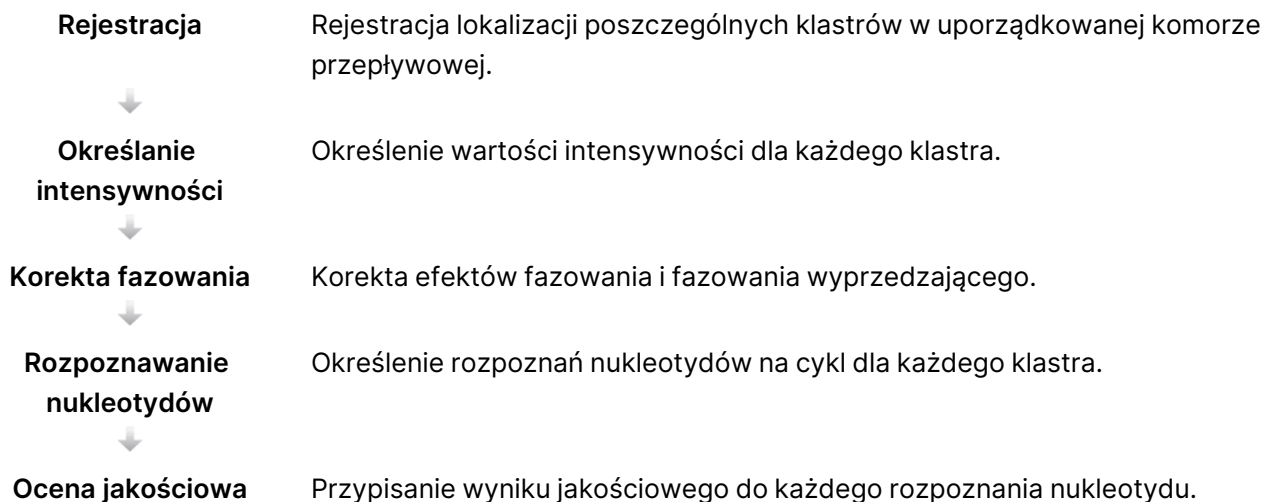
Element komory przepływowej	S2	S4	Opis
Powierzchnie	2	2	Komory przepływowe S2 i S4 są obrazowane na dwóch powierzchniach: górnej i dolnej. Górna powierzchnia płytki jest obrazowana jako pierwsza.
Zbiory w paśmie	4	6	Zbiór to kolumna w pasie komory przepływowej, którą kamera rejestruje jako jeden zeskanowany obraz.
Płytki na zbiór	88	78	Płytki jest częścią zbioru, która przedstawia obrazowany obszar komory przepływowej.
Łączna liczba generowanych płytek	1408	3744	Łączna liczba płytek jest wynikiem równania: pasma × powierzchnie × zbiory × płytki na zbiór.

Nazwa płytki jest pięciocyfrową liczbą, która reprezentuje pozycję płytki w komorze przepływowej. Na przykład nazwa płytki 1_1205 oznacza pasmo 1, powierzchnię górną, zbiór 2, płytkę 5.

- Pierwsza cyfra to numer pasma:
 - 1 lub 2 dla komory przepływowej S2.
 - 1, 2, 3 lub 4 dla komory przepływowej S4.
- Druga cyfra reprezentuje powierzchnię: 1 oznacza górną powierzchnię, a 2 oznacza dolną powierzchnię.
- Trzecia cyfra oznacza numer zbioru:
 - 1, 2, 3 lub 4 dla komory przepływowej S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 lub 6 dla komory przepływowej S4.
- Ostatnie dwie cyfry reprezentują numer płytki. Numeracja zaczyna się od 01 przy wylotowym końcu komory przepływowej, a kończy się na 88 lub 78 przy końcu wlotowym.
 - Od 01 do 88 dla komory przepływowej S2.
 - Od 01 do 78 dla komory przepływowej S4.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Oprogramowanie Real-Time Analysis – procedura



Rejestracja

Rejestracja dopasowuje obraz do obróconej kwadratowej macierzy nanodołków w uporządkowanej komorze przepływowej. Ze względu na uporządkowany układ nanodołków współrzędne X i Y dla poszczególnych klastrów w płytce są wstępnie określone. Dla każdego przebiegu pozycje klastrów są zapisywane w pliku lokalizacji klastrów (s.locs).

Jeśli rejestracja się nie powiedzie dla któregoś z obrazów w cyklu, w danym cyklu nie zostaną utworzone żadne rozpoznania nukleotydów w ramach tej płytki.

Określanie intensywności

Po rejestracji następuje etap określania intensywności, w ramach którego obliczana jest wartość intensywności dla każdego nanodołka na danym obrazie. W przypadku niepowodzenia rejestracji nie można określić intensywności dla danej płytki.

Korekta fazowania

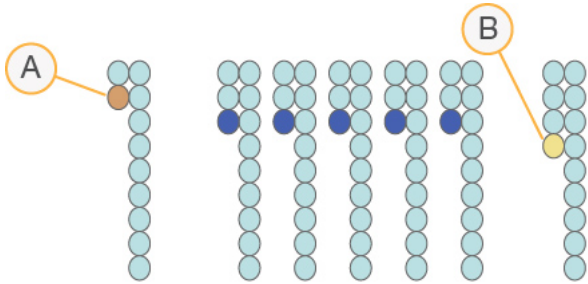
Podczas reakcji sekwencjonowania każda nić DNA w klastrze wydłuża się o jeden nukleotyd na cykl. Fazowanie i fazowanie wyprzedzające występują, gdy nić znajdzie się poza fazą, w której przebiega bieżący cykl dołączania.

Fazowanie występuje, gdy dochodzi do opóźnienia o jedno wprowadzenie nukleotydu.

Fazowanie wyprzedzające występuje, gdy dochodzi do wyprzedzenia o jedno wprowadzenie nukleotydu.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 12 Fazowanie i fazowanie wyprzedzające



- A. Odczyt z nukleotydem na etapie fazowania.
- B. Odczyt z nukleotydem na etapie fazowania wyprzedzającego.

Oprogramowanie RTA3 koryguje efekty fazowania i fazowania wyprzedzającego, co pozwala zmaksymalizować jakość danych w każdym cyklu podczas przebiegu.

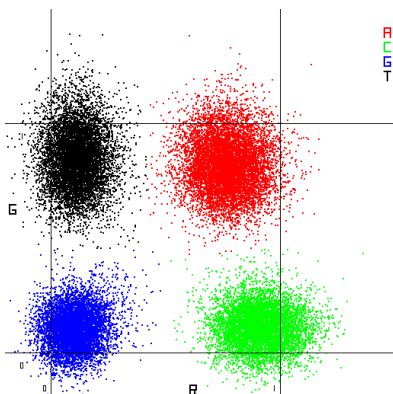
Rozpoznawanie nukleotydów

Rozpoznawanie nukleotydów określa zasadę azotową (A, C, G lub T) dla każdego klastra danej płytki w określonym cyklu. W aparacie Aparat NovaSeq 6000Dx wykorzystywane jest dwukanałowe sekwencjonowanie, które wymaga tylko dwóch obrazów do kodowania danych dla czterech nukleotydów DNA, jednego z kanału zielonego i jednego z kanału czerwonego.

Brak rozpoznania jest identyfikowany jako N. Brak rozpoznań następuje wtedy, gdy klastr nie przechodzi przez filtr, rejestracja kończy się niepowodzeniem albo klastr przesunął się poza obraz.

Intensywności dla każdego klastra są określane na podstawie obrazów czerwonych i zielonych, a następnie są ze sobą porównywane, co powoduje uzyskanie czterech odrębnych populacji. Każda populacja odpowiada zasadzie azotowej. Proces rozpoznawania nukleotydów określa, do której populacji należy każdy klastr.

Rysunek 13 Wizualizacja poziomów intensywności klastrów



Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Tabela 8 Rozpoznawanie nukleotydów w sekwencjonowaniu dwukanałowym

Zasada	Kanał czerwony	Kanał zielony	Wynik
A	1 (wł.)	1 (wł.)	Klastry, które wykazują intensywność zarówno w kanale czerwonym, jak i zielonym.
C	1 (wł.)	0 (wył.)	Klastry, które wykazują intensywność wyłącznie w kanale czerwonym.
G	0 (wył.)	0 (wył.)	Klastry, które nie wykazują intensywności w znanej lokalizacji klastra.
T	0 (wył.)	1 (wł.)	Klastry, które wykazują intensywność wyłącznie w kanale zielonym.

Klastry przechodzące przez filtr

Podczas przebiegu aplikacja RTA3 umożliwia odfiltrowanie nieprzetworzonych danych w celu usunięcia odczytów, które nie spełniają progu jakości danych. Klastry nakładające się i niskiej jakości są usuwane.

W przypadku analizy dwukanałowej oprogramowanie RTA3 wykorzystuje system oparty o populację, aby określić czystość (pomiar czystości intensywności) rozpoznania nukleotydu. Klastry przechodzą przez filtr (PF), gdy nie więcej niż jeden rozpoznany nukleotyd w pierwszych 25 cyklach ma czystość poniżej ustalonego progu. Dopasowanie kontroli PhiX (jeśli jest stosowana) przeprowadza się w cyklu 26 na podzestawie płytek dla klastrów, które przeszły przez filtr. Klastry, które nie przechodzą przez filtr, nie są poddawane rozpoznawaniu nukleotydów ani dopasowywane.

Wyniki jakościowe

Wynik jakościowy określa prawdopodobieństwo rozpoznania niewłaściwego nukleotydu. Wyższy wynik jakościowy wskazuje, że rozpoznanie nukleotydu ma wyższą jakość i większe prawdopodobieństwo poprawności. Po określeniu wyników jakościowych są one zapisywane w plikach CBCL.

Pomiar jakości stanowi zwięzły sposób komunikacji prawdopodobieństwa wystąpienia niewielkich błędów. Wyniki jakościowe są wyświetlane jako $Q(X)$, gdzie X jest wynikiem. W poniższej tabeli przedstawiono relację między wynikiem jakościowym i prawdopodobieństwem błędu.

Wynik jakościowy $Q(X)$	Prawdopodobieństwo błędu
Q40	0,0001 (1 na 10 000)
Q30	0,001 (1 na 1000)
Q20	0,01 (1 na 100)
Q10	0,1 (1 na 10)

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Ocena jakościowa i raportowanie

W ramach oceny jakościowej dla każdego rozpoznania nukleotydu obliczany jest zbiór wartości prognostycznych, które są następnie używane w celu wyszukania wyniku jakościowego w tabeli jakości. Tabele jakości zostały utworzone w celu zapewnienia optymalnej dokładności prognostycznej oceny jakościowej przebiegów wygenerowanych w określonej konfiguracji platformy do sekwencjonowania oraz metody oznaczania.

Wynik jakościowy jest obliczany na podstawie zmodyfikowanej wersji algorytmu Phred.

W celu wygenerowania tabeli jakości dla Aparat NovaSeq 6000Dx ustalono trzy grupy rozpoznań nukleotydów na podstawie klastrowania swoistych cech predykcyjnych. Po pogrupowaniu rozpoznań nukleotydów metodą doświadczalną obliczono średni odsetek błędów dla każdej z trzech grup, a następnie w tabeli jakości zarejestrowano odpowiednie wyniki jakościowe wraz z cechami predykcyjnymi skorelowanymi z konkretną grupą. W rezultacie w przypadku oprogramowania RTA3 możliwe są tylko trzy wyniki jakościowe, które reprezentują średni odsetek błędów grupy. W ujęciu ogólnym wyniki są uproszczone, jednak metoda ta zapewnia bardzo dokładną ocenę jakości. Trzy grupy w tabeli jakości odpowiadają rozpoznaniom nukleotydów o jakości marginalnej (< Q15), średniej (~Q20) i wysokiej (> Q30), a ponadto przypisuje się im swoiste wyniki – odpowiednio 12, 26 i 34. Dodatkowo wynik null wynoszący 2 jest przypisywany w przypadku braku rozpoznania. Taki model raportowania wyników jakościowych zmniejsza wymagania dotyczące ilości przestrzeni dyskowej i przepustowości, a nie wpływa na dokładność ani wydajność.

Rysunek 14 Uproszczone wyniki jakościowe w oprogramowaniu RTA3



Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®


Pliki wyjściowe sekwencjonowania


Typ pliku	Opis, lokalizacja i nazwa pliku
Pliki rozpoznania nukleotydów	<p>W pliku rozpoznania nukleotydów uwzględniany jest każdy przeanalizowany klastrowy, przy czym klastry są grupowane do jednego pliku na cykl, pasmo i powierzchnię. Zagregowany plik zawiera rozpoznanie nukleotydu oraz zakodowaną ocenę jakościową dla każdego klastra.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, na przykład L001_1.cbcl</p>
Pliki lokalizacji klastrów	<p>W przypadku każdej komory przepływowej binarny plik lokalizacji klastra zawiera współrzędne XY dla klastrów w płytce. Heksagonalny układ zgodny z układem nanodołków komory przepływowej wstępnie definiuje współrzędne.</p> <p>Data\Intensities s_[lane].locs</p>
Pliki filtrów	<p>Plik filtra określa, czy klastrowy przeszedł przez filtry. Pliki filtrów są tworzone podczas cyklu 26 z użyciem 25 cykli danych. Dla każdej płytki tworzony jest jeden plik filtra.</p> <p>Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter</p>
Plik informacji o przebiegu	<p>Zawiera nazwę przebiegu, liczbę cykli w poszczególnych odczytach, informację, czy odczyt jest odczytem indeksu, a także liczbę zbiorów i płytek w komorze przepływowej. Plik informacji o przebiegu jest tworzony na początku przebiegu.</p> <p>[Root folder], RunInfo.xml</p>
Pliki miniatur	<p>Obrazy miniatur dla pierwszego cyklu każdego odczytu sekwencjonowania.</p> <p>Thumbnail_Images\L001\C[X.1] – pliki są przechowywane w podfolderze dla każdego cyklu. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg – miniatura zawiera numer kafelka.</p>

Struktura folderu wyjściowego sekwencjonowania

Oprogramowanie NIVOS automatycznie tworzy nazwę folderu wyjściowego.

 **Config** – ustawienia konfiguracji dla przebiegu.


 **Logs** – pliki dzienników opisujące kroki operacyjne, analizy aparatu i zdarzenia w oprogramowaniu RTA3.

 SampleSheet.csv – arkusz próbki lub inny załączony plik, jeśli dotyczy.

 **Data**


 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]** – pliki rozpoznania nukleotydów (*.cbcl) dla pasma zagregowane w jednym pliku na pasmo, powierzchnię i cykl.

 s.locs – plik lokalizacji klastra dla przebiegu.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

 **InterOp** – pliki binarne.

 **Recipe** – plik przepisu charakterystyczny dla przebiegu.

 **Thumbnail Images** – obrazy miniatur na co 10. płytkę.

 **LIMS** – plik konfiguracji przebiegu (*.json), jeśli dotyczy.

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SequenceComplete.txt

 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

 Manifest.tsv

Ostrzeżenia i środki ostrożności



PRZESTROGA

Prawo federalne dopuszcza sprzedaż tego urządzenia wyłącznie lekarzom lub na ich zamówienie, bądź innym specjalistom posiadającym ważną licencję stanu, w którym prowadzą praktykę.

- **Niektóre składniki odczynników dostarczanych przez firmę Illumina do stosowania z aparatem Aparat NovaSeq 6000Dx zawierają potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi.** Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki (SDS) dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.
- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości próbek.
- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami zestawu należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami zestawu należy dokładnie umyć ręce.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

- Przestrzeganie zasad wykonywania prac oraz higieny prac laboratoryjnych jest wymagane, aby chronić produkty reakcji PCR przed zanieczyszczeniem przez odczynniki, przyrządy lub próbki genomowego DNA. Zanieczyszczenie produktów reakcji PCR może powodować niedokładne i niepewne wyniki.
- Aby zapobiegać zanieczyszczeniu produktów, należy upewnić się, że obszary procesu przed amplifikacją i po niej są wyposażone w specjalne przyrządy i materiały eksploatacyjne (np. pipety, końcówki do pipetowania, bloki grzejne, mieszadła wirowe i wirówki).
- Parowanie indeksów z próbkami powinno przebiegać w ścisłej zgodności z układem płytki indeksowej. Aplikacja DNA Prep with Enrichment automatycznie wypełnia startery do indeksowania powiązane z nazwami próbek po ich wprowadzeniu podczas konfiguracji przebiegu. Przed rozpoczęciem przebiegu sekwencjonowania użytkownikowi zaleca się zweryfikowanie powiązań starterów indeksowych z próbkami. Niezgodności między rozkładem próbek a ich przypisaniem na płytce mogą powodować dodatnie rozpoznanie próbki i nieprawidłowe dane w raporcie wyników.
- Instalacja Zdecydowanie zaleca się instalację dostarczonego przez użytkownika oprogramowania chroniącego komputer przed wirusami.
- NovaSeq 6000Dx nie należy użytkować ze zdjętymi panelami. Obsługa aparatu ze zdjętymi panelami stwarza potencjalne ryzyko ekspozycji użytkownika na działanie napięcia sieciowego oraz napięć prądu stałego.
- Nie dotykać platformy w przedziale komory przepływowej. Znajdująca się w tym przedziale grzałka działa w zakresie temperatur od 22°C do 95°C i może spowodować oparzenia.
- Aparat waży około 1059 funtów i w przypadku upuszczenia lub nieprawidłowego obchodzenia się z nim może powodować poważne obrażenia.

Charakterystyka działania

Charakterystykę działania przyrządu NovaSeq 6000Dx ustalono przy użyciu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dla przygotowywania biblioteki, Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli) dla sekwencjonowania oraz aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dla analizy wtórnej, w tym wykrywania wariantów linii zarodkowej i somatycznej. Wykonane badania obejmowały indeksowanie próbek, przenoszenie próbek, poziom wejściowy DNA, czułość analityczną (LoB/LoD), dokładność, precyzję, porównanie metod i odtwarzalność. Informacje na temat cech charakterystyki działania zależnych od czynników przedanalitycznych, takich jak sposób ekstrakcji czy substancje zakłócające, można znaleźć w *Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania Illumina DNA Prep with Enrichment Dx)*.

Definicje obliczeń stosowanych w określaniu parametrów użytkowych

1. Procentową zgodność wyników dodatnich (PPA, ang. Positive Percent Agreement) oblicza się jako odsetek prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu loci sklasyfikowanych jako warianty w oparciu o metodę referencyjną.
 - $(\text{liczba loci wariantowych prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) / (\text{całkowita liczba loci wariantowych})$
Loci wariantowe zgłoszone w oznaczeniu i zgodne z metodą referencyjną stanowią wyniki prawdziwie dodatnie (TP, ang. True Positive). Loci wariantowe zgłoszone w oznaczeniu jako rozpoznania sekwencji referencyjnej lub jako inne rozpoznania wariantowe stanowią wyniki fałszywie ujemne (FN, False Negative).
2. Procentową zgodność wyników ujemnych (NPA, ang. Negative Percent Agreement) oblicza się jako odsetek loci sklasyfikowanych metodą referencyjną jako typ dziki i prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu.
 - $(\text{liczba loci typu dzikiego prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) / (\text{całkowita liczba loci typu dzikiego})$
Loci typu dzikiego zgłoszone w oznaczeniu i zgodne z metodą referencyjną stanowią wyniki prawdziwie ujemne (TN, ang. True Negative). Loci typu dzikiego zgłoszone w oznaczeniu jako warianty stanowią wyniki fałszywie dodatnie (FP, False Positive).
3. Ogólną zgodność procentową (OPA, ang. Overall Percent Agreement) oblicza się jako odsetek loci prawidłowo sklasyfikowanych w oznaczeniu w stosunku do metody referencyjnej.
 - $[(\text{liczba loci wariantowych prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu}) + (\text{liczba loci typu dzikiego prawidłowo zgłoszonych w oznaczeniu})] / [(\text{całkowita liczba loci wariantowych}) + (\text{całkowita liczba loci typu dzikiego})]$
4. Obliczenia PPA, NPA i OPA nie uwzględniają braków rozpoznań (loci wariantowych lub referencyjnych niespełniających warunków jednego lub większej liczby filtrów jakościowych).
5. Procent rozpoznań dodatnich (PPC, Percent Positive Calls) to liczba obserwacji z wykrytym wariantem podzielona przez całkowitą liczbę badanych obserwacji z wyłączeniem obserwacji nieprawidłowych lub odfiltrowanych ze względu na małą głębokość.
6. Procent rozpoznań ujemnych (PNC, Percent Negative Calls) oblicza się jako liczbę obserwacji z wzorcem przechodzącym jako wynikiem na jakiejś pozycji podzieloną przez całkowitą liczbę przetestowanych obserwacji, z wyłączeniem wszelkich obserwacji nieprawidłowych lub odfiltrowanych ze względu na małą głębokość.
7. Procentową zdolność do rozpoznania autosomów (Percent Autosome Callability) oblicza się jako procent pozycji referencyjnych innych niż N w regionach docelowych w chromosomach autosomalnych z przechodzącym rozpoznaniem genotypu.

Indeksowanie próbek

Startery indeksujące próbek dodawane na etapie przygotowywania biblioteki przypisują do każdego DNA próbki unikalną sekwencję. Takie unikalne sekwencje umożliwiają pulowanie wielu próbek w tym samym przebiegu sekwencjonowania. Indeksowanie próbek stosuje się zarówno w procedurach dotyczących linii

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

zarodkowych, jak i somatycznych. Celem badania było wyznaczenie minimalnej (12) i maksymalnej (192) liczby próbek, które mogą być przetwarzane w pojedynczym przebiegu sekwencjonowania w aparacie Aparat NovaSeq 6000Dx. Dwanaście jednoznacznie zidentyfikowanych próbek Platinum Genome DNA (NA12877–NA12888) przebadano przy użyciu co najmniej 12 różnych kombinacji starterów indeksujących na próbkę. Biblioteki próbek przygotowano przy użyciu oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów na wszystkich 23 ludzkich chromosomach. Przykładowe wyniki czterech przebiegów sekwencjonowania z wykorzystaniem przepływu pracy analizy Germline FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx porównano z wersją Platinum Genomes 2016-1.0.

W przypadku pierwszego zestawu przebiegów 192 jednoznacznie zindeksowane biblioteki próbek zostały zsekwencjonowane w dwóch przebiegach sekwencjonowania, z odczytnikami S2 i S4, w celu weryfikacji zarówno maksymalnej liczby obsługiwanych indeksów, jak i zdolności oznaczenia do konsekwentnego rozpoznawania genotypowego dla danej próbki w różnych kombinacjach starterów indeksujących. W drugiej serii przebiegów 12 jednoznacznie zindeksowanych bibliotek próbek poddano sekwencjonowaniu w dwóch przebiegach indeksowania, z odczytnikami S2 i S4, w celu zweryfikowania minimalnej liczby obsługiwanych indeksów.

Dla przebiegów z 192 indeksami wartość PPA dla SNV wynosiła od 99,7% do 100%, wartość PPA dla insercji wynosiła 100%, a dla delecji od 96,7% do 100%, natomiast wartość NPA wynosiła 100%. Dla przebiegów z 12 indeksami wartość PPA dla SNV wynosiła od 99,7% do 100%, wartość PPA dla insercji wynosiła od 89,6% do 100%, a dla delecji od 94,6% do 100%, natomiast wartość NPA wynosiła 100%.

Przenoszenie próbek

Aparat NovaSeq 6000Dx umożliwia sekwencjonowanie wielu próbek, w tym kontroli, w pojedynczym przebiegu. Przeprowadzono badanie mające na celu ocenę stopnia przenoszenia próbek w pojedynczym przebiegu sekwencjonowania oraz między przebiegami sekwencjonowania. Dwanaście próbek Platinum Genome DNA, sześć męskich i sześć żeńskich, zbadano przy użyciu oznaczenia reprezentatywnego mającego na celu rozpoznanie różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów we wszystkich 23 ludzkich chromosomach, w tym w obu chromosomach płciowych. Biblioteki zostały sekwencjonowane w Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu przepływu pracy analizy Germline FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Przeniesienie próbek męskich do próbek żeńskich stwierdzono na podstawie obecności odczytów docelowego chromosomu Y w próbkach żeńskich.

Przeniesienie w ramach pojedynczego przebiegu może zajść w trakcie generowania klastrów, rozpoznawania nukleotydów podczas cyklu odczytu indeksów i demultipleksowania próbek. W celu zbadania przenoszenia próbek w przebiegu sekwencjonowania pulę bibliotek składającą się z co najmniej dwunastu powtórzeń każdej jednoznacznie zidentyfikowanej próbki męskiej i żeńskiej oraz dwóch próbek kontrolnych bez wzorca, w sumie 192 jednoznacznie indeksowanych bibliotek, zsekwencjonowano w Aparat NovaSeq 6000Dx w dwóch przebiegach sekwencjonowania z odczytnikami S2 i S4. Przenoszenie próbek w ramach przebiegu oceniano, porównując pokrycie docelowe chromosomu Y w każdym powtórzeniu próbki żeńskiej w porównaniu ze średnim pokryciem docelowym chromosomu Y we wszystkich powtórzeniach próbek męskich. 95. percentyl obserwowanego przeniesienia w przebiegu wynosił odpowiednio 0,0090% i 0,041% dla odczytników S2 i S4.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

W celu przetestowania przenoszenia próbki pomiędzy przebiegami przygotowano dwie pulę bibliotek i kolejno sekwencjonowano je na jednym Aparat NovaSeq 6000Dx, po stronie A przy użyciu odczynników S4 i po stronie B przy użyciu odczynników S2. Pierwsza pula zawierała co najmniej dwanaście powtórzeń sześciu jednoznacznie zidentyfikowanych próbek żeńskich plus dwie próbki kontrolne bez wzorca, co dało łącznie 96 jednoznacznie indeksowanych bibliotek. Druga pula zawierała co najmniej dwanaście powtórzeń sześciu jednoznacznie zidentyfikowanych próbek męskich plus dwie próbki kontrolne bez wzorca, co dało łącznie 96 jednoznacznie indeksowanych bibliotek. W obu pulach stosowano ten sam zestaw adapterów indeksów. Pulę żeńską sekwencjonowano w pierwszej kolejności, następnie sekwencjonowano pulę męską, a w dalszej kolejności wykonywano powtórzenie sekwencjonowania puli żeńskiej. Przenoszenie próbek między przebiegami oceniano według typów odczynników S2 i S4 porównując pokrycie docelowe chromosomu Y między odpowiednimi powtórzeniami powtórnego przebiegu puli żeńskiej i przebiegu puli męskiej. 95. percentyl obserwowanego przeniesienia pomiędzy przebiegami wynosił odpowiednio 0,0089% i 0,012% dla odczynników S2 i S4.

Poziomy wejściowe DNA

Krew (linia zarodkowa)

Zakres wejściowy DNA we krwi dla zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx przy użyciu aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx został ustalony dla NovaSeq 6000Dx. Oceny ww. zakresu dokonano, wykonując badanie serii rozcieńczeń ośmiu próbek Platinum Genome DNA (NA12877 – NA12884) w reprezentatywnym oznaczeniu rozpoznającym różne geny obejmujące 1 970 505 nukleotydów na 23 różnych ludzkich chromosomach. Biblioteki były sekwencjonowane w jednym Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu jednej partii Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli).

Siedem próbek poddano badaniu w dwóch powtórzeniach przy sześciu poziomach wejściowych DNA z zakresu od 1000 ng do 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng i 10 ng). Ósma próbka (NA12884) była testowana jako pojedyncze powtórzenie przy poziomie wejściowym 10 ng i w dwóch powtórzeniach dla wszystkich pozostałych poziomów wejściowych. W celu wyznaczenia dokładności genotypy próbek porównano do genotypów z bazy danych Platinum Genomes w wersji 2016-1.0. Wyniki zostały określone dla każdego poziomu wejściowego. PPA dla każdego typu wariantu (SNV, insercje i delecje) jest przedstawione w [Wyniki PPA dla każdego poziomu wejściowego DNA krwi w zależności od rodzaju wariantu na stronie 35](#). NPA przedstawiono w [NPA dla każdego poziomu wejściowego DNA we krwi na stronie 35](#). Wszystkie poziomy wejściowe charakteryzowały się podobną dokładnością. Poziom wejściowy DNA zalecany dla Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wynosi 50–1000 ng przy 1000 ng i 10 ng jako górną i dolną granicą wartości, dla których zachowana jest zgodność z charakterystyką działania przy sekwencjonowaniu za pomocą urządzenia NovaSeq 6000Dx.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Tabela 9 Wyniki PPA dla każdego poziomu wejściowego DNA krwi w zależności od rodzaju wariantu

Poziom wejściowy DNA (ng)	Typ wariantu	Warianty oczekiwane	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	PPA (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1000		74112	73	7	99,9	
10	Insercja	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50		2914	8	6	99,7	
100		2917	6	5	99,8	
250		2928	0	0	100	
1000		2921	5	2	99,8	
10	Delecja	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	>99,9	
250		2201	0	39	100	
1000		2195	2	43	99,9	

Tabela 10 NPA dla każdego poziomu wejściowego DNA we krwi

Poziom wejściowy DNA (ng)	TN	FP	Brak rozpoznań wzorca	NPA (%)
10	115449045	384	285751	> 99,9
25	123012157	415	438153	> 99,9
50	122985299	369	465043	> 99,9
100	122976660	321	473730	> 99,9
250	122971099	331	479289	> 99,9
1000	122978527	324	471882	> 99,9

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

FFPE (somatyczne)

Zakres wejściowy DNA utrwalonego w formalinie, zatopionego w parafinie (FFPE) dla zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z zastosowaniem aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx został ustalony dla NovaSeq 6000Dx. Oceny ww. zakresu dokonano, wykonując badanie serii rozcieńczeń dwóch próbek Platinum Genome w reprezentatywnym oznaczeniu rozpoznającym różne geny obejmujące 1 970 505 nukleotydów na 23 różnych ludzkich chromosomach. Biblioteki były sekwencjonowane w jednym Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu jednej partii Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli).

DNA z próbki linii komórkowej GM12877 rozcieńczono za pomocą DNA z próbki linii komórkowej GM12878, uzyskując próbkę GM12877-13 z unikalnymi wariantami heterozygotycznymi i homozygotycznymi GM12877 o częstościach występowania wariantów zbliżonych do 6,5% i 13%. Przetestowano również nierozcieńczony GM12877. GM12877-13 poddano badaniu w dwóch powtórzeniach przy czterech poziomach wejściowych DNA z zakresu od 1000 ng do 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng i 25 ng). GM12877 było testowane jako pojedyncze powtórzenie przy 250 ng i w dwóch powtórzeniach dla wszystkich pozostałych poziomów wejściowych. W celu wyznaczenia dokładności rozpoznania wariantów próbek porównano do genotypów z bazy danych Platinum Genomes w wersji 2016-1.0. Wyniki zostały określone dla każdego poziomu wejściowego. PPA dla każdego typu wariantu (SNV, insercje i delecje) jest przedstawione w [Wyniki PPA dla każdego poziomu wejściowego DNA w zależności od rodzaju wariantu na stronie 36](#). NPA przedstawiono w [NPA dla każdego poziomu wejściowego DNA w próbkach FFPE na stronie 37](#). Wszystkie poziomy wejściowe charakteryzowały się podobną dokładnością. Dla próbek FFPE o wartości $\Delta Cq \leq 5$ zalecany poziom wejściowy DNA dla wynosi 50–1000 ng dla zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx przy 1000 ng i 25 ng jako górnej i dolnej granicy wartości, dla których zachowana jest zgodność z charakterystyką działania przy sekwencjonowaniu za pomocą urządzenia NovaSeq 6000Dx.

Tabela 11 Wyniki PPA dla każdego poziomu wejściowego DNA w zależności od rodzaju wariantu

Poziom wejściowy DNA (ng)	Typ wariantu	Warianty oczekiwane	VAF w docelowym rozcieńczeniu								
			0,065					0,13			
			TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	PPA (%)	Warianty oczekiwane	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	PPA (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	Insercja	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Delecja	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

Tabela 12 NPA dla każdego poziomu wejściowego DNA w próbkach FFPE

Poziom wejściowy DNA (ng)	Oczekiwany typ dziki	TN	FP	Brak rozpoznań wzorca	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	> 99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	> 99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	> 99,9
1000	29030903	29030596	307	1822781	> 99,9

Czułość analityczna (granica próby ślepej [LoB]) i granica wykrywalności [LoD]

Badanie to przeprowadzono w celu oceny granicy próby ślepej (LoB) i granicy wykrywalności (LoD) dla przepływu pracy analizy generowania Somatic FASTQ i VCF aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx w Aparat NovaSeq 6000Dx. W tym badaniu użyto oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów na wszystkich 23 ludzkich chromosomach. Linie komórkowe Platinum Genome GM12878 i GM12877 utrwalono w formalinie i zatopiono w parafinie, po czym dokonano ekstrakcji DNA. Rozcieńczenia GM12877 do GM12878 przygotowano do wytworzenia próbek zawierających 0%, 4%, 6,5% i 13% GM12877 według objętości, tak że częstotliwości wariantów w przypadku 489 jednoznacznie zidentyfikowanych wariantów GM12877 (454 SNV, 17 insercji i 18 delecji) mieściły się w zakresie od 0 do 0,13. Biblioteki próbek przygotowano przy użyciu dwóch partii odczynników z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx i sekwencjonowano w ciągu sześciu kolejnych dni rozpoczęcia z dwoma Aparat NovaSeq 6000Dx i dwiema partiami Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, ver. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, ver. 1.5 (300 cykli), co daje w sumie dwanaście przebiegów sekwencjonowania. W wyniku tego uzyskano 288 obserwacji dla każdego wariantu w każdym z rozcieńczeń próbki. Wartości granicy próby ślepej (LoB) i granicy wykrywalności (LoD) obliczono przy użyciu klasycznego podejścia przedstawionego w CLSI EP17-A2. LoB i LoD obliczono osobno dla odczynników S2 i S4, łącząc częstotliwości wariantów wszystkich wariantów w przebiegu sekwencjonowania dla każdego typu odczynnika. Prawdopodobieństwo błędu pierwszego rodzaju zdefiniowano jako 0,01, zaś prawdopodobieństwo błędu drugiego rodzaju zdefiniowano jako 0,05.

LoB oceniono dla 489 loci niezależnie dla dwóch partii sekwencjonowania dla każdego typu odczynnika (S2 lub S4) i przygotowania biblioteki. Dla odczynników S2 95. percentyl LoB wynosił 2,9%. Dla odczynników S4 95. percentyl LoB wynosił 2,2%.

LoD obliczono pomyślnie dla 478 z 489 wariantów dla S2 i 485 z 489 wariantów dla S4. Warianty, w których nie określono LoD dla jednego lub obu przygotowań biblioteki, zostały wykluczone z ostatecznego przypisania LoD do systemu NovaSeq 6000Dx. LoD systemu NovaSeq 6000Dx z odczynnikami S2 i S4 określono przyjmując 95. percentyl poszczególnych wariantów LoD. Dla odczynników S2 95. percentyl dla 478 wariantów LoD wynosił 4,8%. Dla odczynników S4 95. percentyl dla 485 wariantów LoD wynosił 3,9%.

Dokładność

Linia zarodkowa

Przeprowadzono następujące badanie w celu oceny dokładności rozpoznawania wariantów procedury analizy generacji Germline FASTQ i VCF aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx w Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli). Cztery unikalne próbki z materiału DNA Platinum Genome zostały przetestowane przy użyciu reprezentatywnego oznaczenia zaprojektowanego w celu rozpoznania szeregu genów wchodzących w skład 1 970 505 nukleotydów (9232 sekwencje docelowe) we wszystkich 23 ludzkich chromosomach. Każda z próbek była testowana w 12 powtórzeniach, z wyjątkiem próbki NA12880, która była testowana w 11 powtórzeniach. Wykonano w sumie 18 przebiegów z użyciem trzech aparatów do sekwencjonowania, trzech serii odczynników S2 z udziałem dwóch operatorów w okresie sześciu dni rozpoczynania oznaczeń. Dokładność została określona dla wariantów SNV, insercji i delecji przez porównanie wyników badania z bazą danych Platinum Genomes w wersji 2016-1.0.

Tabela 13 Podsumowanie zgodności dla linii zarodkowej

Kryteria	Obserwacje łącznie ¹	Wynik obserwacji ²	Wynik dla przebiegu ³
PPA dla SNV	846	99,8	99,9
PPA dla insercji	846	97,9	> 99,9
PPA dla delecji	846	96,9	99,9
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹ Obliczone jako liczba próbek na przebieg (47) × liczba przebiegów (18) = 846.

² Najniższa obserwowana wartość dla powtórzenia próbki we wszystkich 18 przebiegach.

³ Najniższa wartość w połączonej analizie danych z każdego przebiegu.

Tabela [Zgodność wariantów linii zarodkowej w zależności od próbki na stronie 39](#) zawiera dane z badania prezentowane w postaci procentowych zgodności wyników dodatnich i ujemnych dla poszczególnych próbek, przy czym na potrzeby obliczeń zgodności PPA wyniki wariantów są porównywane z bazą danych Platinum Genomes w wersji 2016-1.0. Trzy typy wariantów (SNV, insercje i delecje)

zostały ze sobą połączone. Ponieważ metoda referencyjna dostarcza tylko wyniki dotyczące wariantów pojedynczych nukleotydów oraz insercji/delecji, wyniki nukleotydów niewariantowych na potrzeby obliczeń zgodności NPA porównywane są z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego.

Tabela 14 Zgodność wariantów linii zarodkowej w zależności od próbki

Próbka	Zdolność rozpoznawania autosomów	Warianty oczekiwane ¹	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273 672	273 452	220	0	4 147 651 31	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265 680	265 208	234	238	414 803 691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261 792	261 792	0	0	414 746 986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246 114	245 551	399	164	380 157 538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ Całkowita liczba wariantów we wszystkich powtórzeniach próbki w 18 przebiegach.

Tabela [Zgodność wariantów linii zarodkowej w zależności od typu wariantu w próbce na stronie 39](#) zawiera dane z badania prezentowane dla poszczególnych próbek, przy czym wyniki wariantów zostały porównane z dobrze scharakteryzowaną, złożoną metodą referencyjną. Wykrywalność została oceniona oddzielnie dla każdego rodzaju wariantu – SNV, insercji i delecji. Pozycje referencyjne zostały wykluczone.

Tabela 15 Zgodność wariantów linii zarodkowej w zależności od typu wariantu w próbce

Próbka	Numery SVN			Insercje			Delecje		
	Oczekiwane	TP	FN	Oczekiwane	TP	FN	Oczekiwane	TP	FN
NA12877	255 096	254 877	219	10 368	10 367	1	8208	8208	0
NA12878	250 344	250 077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246 024	246 024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229 482	229 086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

Próbki poddano dalszej analizie pod kątem rozpoznawania małych insercji i delecji (polimorfizmów typu indel). Ogólne podsumowanie przedstawiono w tabeli [Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel w module do wykrywania wariantów linii zarodkowej na stronie 40](#). Obecnych było w sumie 210 polimorfizmów typu indel o wielkości od 1 do 18 bp w przypadku insercji i od 1 do 21 bp w przypadku delecji.

Tabela 16 Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel w module do wykrywania wariantów linii zarodkowej

Typ wariantu	Warianty oczekiwane	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	PPA
Insercja	36 954	36 953	1	0	> 99,9
Delecja	29 358	28 986	16	356	99,9

Oznaczenie reprezentatywne składało się z 9232 sekwencji docelowych zaprojektowanych tak, aby pokryć szeroki zakres zawartości materiału genetycznego. Zawartość GC w sekwencjach docelowych mieściła się w zakresie 0,20–0,86. Sekwencje docelowe charakteryzowały się również pewnym zakresem powtórzeń pojedynczych nukleotydów (np. PolyA, PolyT), dinukleotydów i trinukleotydów. Dane kompilowane na podstawie liczby chromosomów w celu określenia wpływu zawartości genomowej na odsetek prawidłowych rozpoznań przedstawiono w tabeli [Dokładność oznaczeń wariantów linii zarodkowej na poziomie chromosomów na stronie 40](#). Odsetek prawidłowych rozpoznań obejmuje rozpoznania wariantu i wzorca i jest mniejszy od 100% w przypadku nieprawidłowych rozpoznań lub braku rozpoznań.

Tabela 17 Dokładność oznaczeń wariantów linii zarodkowej na poziomie chromosomów

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr1	47	728	138 328	Poli A (12), Poli C (7), Poli T (14), Poli G (7), Dinukleotyd (22), Trinukleotydy (8), Insercja (18), Delecja (4)	[0,22 – 0,8]; mediana: 0,51	114 888 718	34	966 860	> 99,9	0,83

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr2	39	628	159 588	Poli A (46), Poli C (8), Poli T (23), Poli G (7), Dinukleotyd (22), Trinukleotyd (8), Insercja (5), Delecja (2)	[0,24 – 0,81]; mediana: 0,44	132 293 464	798	460 345	> 99,9	0,35
chr3	38	650	137 627	Poli A (18), Poli C (6), Poli T (18), Poli G (7), Dinukleotyd (12), Trinukleotyd (6), Insercja (11), Delecja (1)	[0,25 – 0,86]; mediana: 0,45	114 625 053	2	226 461	> 99,9	0,20

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr4	17	370	73 766	Poli A (9), Poli C (7), Poli T (25), Poli G (6), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (5), Insercja (2), Delecja (2)	[0,27 – 0,77]; mediana: 0,45	61 872 303	0	66 741	100	0,11
chr5	25	507	90 008	Poli A (10), Poli C (6), Poli T (12), Poli G (7), Dinukleotyd (10), Trinukleotyd (8), Insercja (8), Delecja (18)	[0,29 – 0,79]; mediana: 0,46	75 314 497	912	153 061	> 99,9	0,20

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr6	39	453	126 721	Poli A (28), Poli C (7), Poli T (33), Poli G (7), Dinukleotyd (18), Trinukleotyd (11), Insercja (4), Delecja (2)	[0,24 – 0,79]; mediana: 0,48	103 412 695	1	182 361	> 99,9	0,18
chr7	21	450	161 501	Poli A (27), Poli C (8), Poli T (21), Poli G (7), Dinukleotyd (31), Trinukleotyd (5), Insercja (1), Delecja (4)	[0,2 - 0,77]; mediana: 0,46	132 534 074	19	246 884	> 99,9	0,19

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomyczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr8	18	381	67 775	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (13), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (9), Insercja (4), Delecja (1)	[0,26 – 0,78]; mediana: 0,47	56 247 612	411	170 925	> 99,9	0,30
chr9	23	347	87 100	Poli A (12), Poli C (7), Poli T (27), Poli G (8), Dinukleotyd (9), Trinukleotyd (9), Insercja (4), Delecja (1)	[0,27 – 0,83]; mediana: 0,49	72 650 800	20	241 991	> 99,9	0,33

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomyczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr10	14	317	66 723	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (6), Dinukleotyd (16), Trinukleoty d (6), Insercja (1), Delecja (1)	[0,23 – 0,78]; mediana: 0,44	55 539 058	1	188 216	> 99,9	0,34
chr11	29	511	91 786	Poli A (28), Poli C (8), Poli T (21), Poli G (7), Dinukleotyd (26), Trinukleoty d (7), Insercja (2), Delecja (2)	[0,28 – 0,8]; mediana: 0,47	75 744 222	742	259 258	> 99,9	0,34

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr12	29	577	120 365	Poli A (19), Poli C (8), Poli T (40), Poli G (7), Dinukleotyd (7), Trinukleoty d (7), Insercja (1), Delecja (5)	[0,26 – 0,77]; mediana: 0,49	99 972 530	1	542 005	> 99,9	0,54
chr13	13	283	58 639	Poli A (24), Poli C (6), Poli T (12), Poli G (7), Dinukleotyd (6), Trinukleoty d (8), Insercja (14), Delecja (0)	[0,28 – 0,79]; mediana: 0,42	48 503 179	1	45 666	> 99,9	0,09

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomyczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr14	11	147	26 980	Poli A (21), Poli C (6), Poli T (18), Poli G (11), Dinukleotyd (6), Trinukleotyd (6), Insercja (4), Delecja (1)	[0,29 – 0,77]; mediana: 0,47	22 286 153	198	147 895	> 99,9	0,66
chr15	15	266	52 091	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (13), Poli G (6), Trinukleotyd (8), Insercja (4), Delecja (6)	[0,29 – 0,76]; mediana: 0,46	43 600 279	0	99 041	100	0,23

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr16	21	366	80 030	Poli A (7), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleoty d (10), Insercja (15), Delecja (21)	[0,3 - 0,76]; mediana: 0,54	65 490 245	16	1 438 278	> 99,9	2,15
chr17	36	645	118 062	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (18), Poli G (8), Dinukleotyd (13), Trinukleoty d (6), Insercja (18), Delecja (16)	[0,28 – 0,82]; mediana: 0,49	97 929 929	417	335 905	> 99,9	0,34

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr18	9	99	19 195	Poli A (7), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (6), Trinukleoty d (10), Insercja (4), Delecja (0)	[0,22 – 0,78]; mediana: 0,44	15 967 171	312	42 077	> 99,9	0,26
chr19	30	605	104 004	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (31), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleoty d (7), Insercja (2), Delecja (21)	[0,33 – 0,83]; mediana: 0,59	85 642 066	3	678 213	> 99,9	0,79
chr20	12	179	33 795	Poli A (6), Poli C (6), Poli T (7), Poli G (8), Trinukleoty d (9), Insercja (5), Delecja (0)	[0,31 – 0,84]; mediana: 0,53	28 108 712	0	38 374	100	0,14

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr21	5	63	30 642	Poli A (28), Poli C (6), Poli T (24), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Insercja (2), Delecja (5)	[0,22 – 0,78]; mediana: 0,52	25 319 736	50	57 434	> 99,9	0,23
chr22	10	187	36 727	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (19), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleoty d (6), Insercja (6), Delecja (0)	[0,27 – 0,74]; mediana: 0,51	30 258 131	0	42 673	100	0,14

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomyczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chrX	23	433	83 576	Poli A (18), Poli C (8), Poli T (23), Poli G (9), Dinukleotyd (5), Trinukleoty d (23), Insercja (3), Delecja (0)	[0,2 - 0,72]; mediana: 0,48	67 318 722	0	770 544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poli A (11), Poli C (8), Poli T (11), Poli G (5), Insercja (0), Delecja (0)	[0,4 - 0,59]; mediana: 0,45	0	0	0	nd.	nd.

Wyniki sekwencjonowania próbki NA12878 porównano z genotypem o wysokim poziomie ufności, ustalonym dla próbki NA12878 przez ośrodek NIST (National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Na sumaryczną liczbę 9232 sekwencji docelowych 8009 w pełni zawierało się w regionach genomu o wysokim poziomie ufności, 776 częściowo nakładało się na te regiony, zaś 447 nie nakładało się na sekwencję NIST. W rezultacie dla każdego powtórzenia uzyskano 1 831 483 współrzędnych do porównań. Rozpoznane nukleotydy niewariantowe zostały porównane z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego. Wyniki dokładności przedstawiono w tabeli [Zgodność wariantów linii zarodkowych próbki NA12878 z bazą danych NIST na stronie 51](#).

Tabela 18 Zgodność wariantów linii zarodkowych próbki NA12878 z bazą danych NIST

Próbka	Liczba uwzględnionych sekwencji docelowych	Zdolność rozpoznawania autosomów	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247 709	218	394 262 149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

W oparciu o dane dostarczone z 18 przebiegów analizy wariantów linii zarodkowej Aparat NovaSeq 6000Dx jest w stanie powtarzalnie sekwencjonować:

- Zawartość GC \geq 20% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 1692 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 20% zawartością GC zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0%).
- Zawartość GC \leq 86% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 86% zawartością GC rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0%).
- Łańcuchy PoliA o długości \leq 46 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 46 powtórzeniami PoliA prawidłowo rozpoznany przy współczynniku braku rozpoznań wynoszącym 0,27%)
- Długości PoliT \leq 40 (13 384 074 z 13 384 321 nukleotydów rozpoznanych w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 40 powtórzeniami PoliT prawidłowo rozpoznany przy współczynniku braku rozpoznania wynoszącym 0,26%)
- Długości PoliG \leq 11 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych zawierających powtórzenie PoliG złożone z 11 nukleotydów zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0%).
- Długości PoliC \leq 8 (9 815 030 z 9 815 035 nukleotydów rozpoznanych w 5922 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 8 powtórzeniami PoliC prawidłowo rozpoznany przy odsetku braku rozpoznań wynoszącym 0,53%)
- Powtórzenia dinukleotydowe o długości \leq 31x (32 233 922 z 32 233 926 wszystkich zidentyfikowanych nukleotydów w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 31-krotnym powtórzeniem dinukleotydu zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0,21%).
- Powtórzenia trinukleotydowe o długości \leq 23x (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 23-krotnym powtórzeniem trinukleotydu zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 0,21%).
- Insercje o długości \leq 18 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 1692 sekwencjonowanych obszarach docelowych zawierających insercję 18-nukleotydową zostały rozpoznane prawidłowo przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 7,71%).
- Delecje o długości \leq 21 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 1692 sekwencjonowanych obszarach docelowych zawierających delecję 21-nukleotydową zostały rozpoznane poprawnie przy odsetku braku rozpoznań na poziomie 1,14%).

Warianty somatyczne

Opisane tutaj badanie zostało wykorzystane do oceny dokładności rozpoznawania wariantów w ramach procedury analizy generacji Somatic FASTQ i VCF aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx w Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli).

W tym badaniu użyto oznaczenia reprezentatywnego w celu rozpoznania różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów (9232 sekwencji docelowych) znajdujących się w 23 różnych chromosomach. Materiał DNA Platinum Genome wyekstrahowano z poddanych obróbce bloków FFPE, tworząc cztery unikalne próbki oceniane w badaniu.

DNA z próbki linii komórkowej GM12877 rozcieńczono za pomocą DNA z próbki linii komórkowej GM12878, uzyskując próbkę GM12877-13 z unikalnymi wariantami heterozygotycznymi i homozygotycznymi GM12877 o częstościach występowania wariantów zbliżonych do 6,5% i 13%. DNA z próbki linii komórkowej GM12878 rozcieńczono za pomocą DNA z próbki linii komórkowej GM12877, uzyskując próbkę GM12878-13 z unikalnymi wariantami heterozygotycznymi i homozygotycznymi GM12878 o częstościach występowania wariantów zbliżonych do 6,5% i 13%. Przetestowano również nierozcieńczone próbki GM12877 i GM12878. Każda z próbek była testowana w 12 powtórzeniach, z wyjątkiem nierozcieńczonej próbki GM12878, która była testowana w 11 powtórzeniach. Wykonano w sumie osiemnaście przebiegów z użyciem trzech aparatów do sekwencjonowania, trzech serii odczynników S4 z udziałem dwóch operatorów w okresie sześciu dni rozpoczynania oznaczeń. Dokładność została określona dla wariantów SNV, insercji i delecji przez porównanie wyników badania z bazą danych Platinum Genomes w wersji 2016-1.0.

Tabela 19 Podsumowanie zgodności wariantów somatycznych

Kryteria	Liczba obserwacji ¹	Wynik dla obserwacji ²	Wynik dla przebiegu ³
PPA dla somatycznych SNV	846	99,8	98,9
PPA dla somatycznych insercji	846	100	100
PPA dla somatycznych delecji	846	100	100
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹ Obliczona wartość = liczba próbek na przebieg (47) × liczba przebiegów (18) = 846.

² Najniższa obserwowana wartość dla powtórzenia próbki we wszystkich 18 przebiegach.

³ Najniższa wartość w połączonej analizie danych z każdego przebiegu.

Tabela [Zgodność wariantów somatycznych w zależności od próbki na stronie 54](#) zawiera dane z badania prezentowane w postaci procentowych zgodności wyników dodatnich i ujemnych dla poszczególnych próbek, przy czym na potrzeby obliczeń zgodności PPA wyniki wariantów są porównywane z dobrze scharakteryzowanymi, złożonymi danymi referencyjnymi. Trzy typy wariantów (SNV, insercje i delecje) zostały ze sobą połączone. Ponieważ metoda referencyjna dostarcza tylko wyniki dotyczące wariantów pojedynczych nukleotydów oraz insercji/delecji, wyniki nukleotydów niewariantowych na potrzeby obliczeń zgodności NPA porównywane są z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego.

Tabela 20 Zgodność wariantów somatycznych w zależności od próbki

Próbka	Zdolność rozpoznawania autosomów	Warianty oczekiwane	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96 228	95 022	198	1008	365 425 810	1203	99,8	> 99,9	>99,9
GM12878	94,5	96 768	96 278	0	490	395 002 023	1278	100	> 99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104 976	103 029	216	1731	395 989 324	1286	99,8	> 99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96 768	96 027	0	741	397 900 884	1218	100	> 99,9	>99,9

Tabela [Zgodność wariantów somatycznych w zależności od rodzaju wariantu w próbce na stronie 54](#) zawiera dane z badania prezentowane dla poszczególnych próbek, przy czym wyniki wariantów zostały porównane z dobrze scharakteryzowaną, złożoną metodą referencyjną. Wykrywalność została oceniona oddzielnie dla każdego rodzaju wariantu – SNV, insercji i delecji. Pozycje referencyjne zostały wykluczone.

Tabela 21 Zgodność wariantów somatycznych w zależności od rodzaju wariantu w próbce

Próbka	Warianty SNV			Insercje			Delecje		
	Oczekiwane	TP	FN	Oczekiwane	TP	FN	Oczekiwane	TP	FN
GM12877	89 694	88 488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92 664	92 390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97 848	95 901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92 664	92 139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

Cztery próbki poddano dalszej analizie pod kątem rozpoznawania małych insercji i delecji (polimorfizmów typu indel). Ogólne podsumowanie przedstawiono w tabeli [Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel wariantów somatycznych na stronie 55](#). Obecnych było w sumie 210 polimorfizmów typu indel o wielkości od 1 do 18 bp w przypadku insercji i od 1 do 21 bp w przypadku delecji.

Tabela 22 Podsumowanie wykrywania polimorfizmów typu indel wariantów somatycznych

Typ wariantu	Warianty oczekiwane	TP	FN	Brak rozpoznania wariantu	PPA
Insercja	11 772	11 772	0	0	100
Delecja	10 098	9666	0	432	100

Oznaczenie reprezentatywne składało się z 9232 sekwencji docelowych zaprojektowanych tak, aby pokryć szeroki zakres zawartości materiału genetycznego. Zawartość GC w sekwencjach docelowych mieściła się w zakresie 0,20–0,86. Sekwencje docelowe charakteryzowały się również pewnym zakresem powtórzeń pojedynczych nukleotydów (np. PolyA, PolyT), dinukleotydów i trinukleotydów. Dane kompilowane na podstawie liczby chromosomów w celu określenia wpływu zawartości genomowej na odsetek prawidłowych rozpoznań przedstawiono w tabeli [Dokładność oznaczeń wariantów somatycznych na poziomie chromosomów na stronie 55](#). Odsetek prawidłowych rozpoznań obejmuje rozpoznania wariantu i wzorca i jest mniejszy od 100% w przypadku nieprawidłowych rozpoznań lub braku rozpoznań.

Tabela 23 Dokładność oznaczeń wariantów somatycznych na poziomie chromosomów

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr1	47	728	138 328	Poli A (12), Poli C (7), Poli T (14), Poli G (7), Dinukleotyd (22), Trinukleotyd (8), Insercja (3), Delecja (0)	[0,22 - 0,8]; mediana: 0,51	110145939	52	5642613	> 99,9	4,9

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznania	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr2	39	628	159 588	Poli A (46), Poli C (8), Poli T (23), Poli G (7), Dinukleotyd (22), Trinukleotyd (8), Insercja (5), Delecja (1)	[0,24 - 0,81]; mediana: 0,44	126795713	842	5850393	> 99,9	4,4
chr3	38	650	137 627	Poli A (18), Poli C (6), Poli T (18), Poli G (7), Dinukleotyd (12), Trinukleotyd (6), Insercja (1), Delecja (1)	[0,25 - 0,86]; mediana: 0,45	109902527	593	4889226	> 99,9	4,3

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr4	17	370	73 766	Poli A (9), Poli C (7), Poli T (25), Poli G (6), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (5), Insercja (0), Delecja (1)	[0,27 - 0,77]; mediana: 0,45	59373461	16	2517412	> 99,9	4,1
chr5	25	507	90 008	Poli A (10), Poli C (6), Poli T (12), Poli G (7), Dinukleotyd (10), Trinukleotyd (8), Insercja (8), Delecja (18)	[0,29 - 0,79]; mediana: 0,46	72261191	723	3116981	> 99,9	4,1

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr6	39	453	126 721	Poli A (28), Poli C (7), Poli T (33), Poli G (7), Dinukleotyd (18), Trinukleotyd (11), Insercja (0), Delecja (1)	[0,24 - 0,79]; mediana: 0,48	98593101	687	4890221	> 99,9	4,7
chr7	21	450	161 501	Poli A (27), Poli C (8), Poli T (21), Poli G (7), Dinukleotyd (31), Trinukleotyd (5), Insercja (1), Delecja (4)	[0,2 - 0,77]; mediana: 0,46	126913574	104	5773856	> 99,9	4,4

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr8	18	381	67 775	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (13), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (9), Insercja (4), Delecja (0)	[0,26 - 0,78]; mediana: 0,47	53430489	175	2958909	> 99,9	5,2
chr9	23	347	87 100	Poli A (12), Poli C (7), Poli T (27), Poli G (8), Dinukleotyd (9), Trinukleotyd (9), Insercja (0), Delecja (1)	[0,27 - 0,83]; mediana: 0,49	69594586	74	3260257	> 99,9	4,5

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr10	14	317	66 723	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (6), Dinukleotyd (16), Trinukleotyd (6), Insercja (0), Delecja (0)	[0,23 - 0,78]; mediana: 0,44	53209592	90	2469444	> 99,9	4,4
chr11	29	511	91 786	Poli A (28), Poli C (8), Poli T (21), Poli G (7), Dinukleotyd (26), Trinukleotyd (7), Insercja (2), Delecja (2)	[0,28 - 0,8]; mediana: 0,47	72291795	150	3665560	> 99,9	4,8

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznania	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr12	29	577	120 365	Poli A (19), Poli C (8), Poli T (40), Poli G (7), Dinukleotyd (7), Trinukleotyd (7), Insercja (0), Delecja (3)	[0,26 - 0,77]; mediana: 0,49	96109352	101	4331932	> 99,9	4,3
chr13	13	283	58 639	Poli A (24), Poli C (6), Poli T (12), Poli G (7), Dinukleotyd (6), Trinukleotyd (8), Insercja (14), Delecja (0)	[0,28 - 0,79]; mediana: 0,42	46130028	44	2384839	> 99,9	4,9

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr14	11	147	26 980	Poli A (21), Poli C (6), Poli T (18), Poli G (11), Dinukleotyd (6), Trinukleotyd (6), Insercja (4), Delecja (0)	[0,29 - 0,77]; mediana: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52 091	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (13), Poli G (6), Trinukleotyd (8), Insercja (4), Delecja (0)	[0,29 - 0,76]; mediana: 0,46	41918631	184	1753300	> 99,9	4,0

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr16	21	366	80 030	Poli A (7), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (10), Insercja (15), Delecja (21)	[0,3 - 0,76]; mediana: 0,54	62344351	18	4540539	> 99,9	6,8
chr17	36	645	118 062	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (18), Poli G (8), Dinukleotyd (13), Trinukleotyd (6), Insercja (18), Delecja (1)	[0,28 - 0,82]; mediana: 0,49	93811318	414	4403622	> 99,9	4,5

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznania	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr18	9	99	19 195	Poli A (7), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (6), Trinukleotyd (10), Insercja (0), Delecja (0)	[0,22 - 0,78]; mediana: 0,44	15007653	6	990633	> 99,9	6,2
chr19	30	605	104 004	Poli A (19), Poli C (7), Poli T (31), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (7), Insercja (2), Delecja (3)	[0,33 - 0,83]; mediana: 0,59	81416722	455	4860311	> 99,9	5,6
chr20	12	179	33 795	Poli A (6), Poli C (6), Poli T (7), Poli G (8), Trinukleotyd (9), Insercja (5), Delecja (0)	[0,31 - 0,84]; mediana: 0,53	26833936	7	1301905	> 99,9	4,6

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomiczna	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chr21	5	63	30 642	Poli A (28), Poli C (6), Poli T (24), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Insercja (1), Delecja (0)	[0,22 - 0,78]; mediana: 0,52	24169250	44	1172087	> 99,9	4,6
chr22	10	187	36 727	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (19), Poli G (7), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (6), Insercja (6), Delecja (0)	[0,27 - 0,74]; mediana: 0,51	28887217	86	1392179	> 99,9	4,6

Chromosom	Liczba genów	Liczba sekwencji docelowych	Liczba nukleotydów	Zawartość genomowa	Zakres GC	Prawidłowe rozpoznania	Nieprawidłowe rozpoznania	Brak rozpoznań	Odsetek prawidłowo rozpoznanych nukleotydów	Liczba nierozpoznanych nukleotydów
chrX	23	433	83 576	Poli A (18), Poli C (8), Poli T (23), Poli G (9), Dinukleotyd (5), Trinukleotyd (23), Insercja (3), Delecja (0)	[0,2 - 0,72]; mediana: 0,48	64231080	241	3852253	> 99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poli A (11), Poli C (8), Poli T (11), Poli G (5), Insercja (0), Delecja (0)	[0,4 - 0,59]; mediana: 0,45	0	0	0	nd.	nd.

Wyniki sekwencjonowania próbki linii komórkowej GM12878 porównano z genotypem o wysokim poziomie ufności, ustalonym dla próbki NA12878 przez Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (NIST, National Institutes of Standards and Technology) (v.2.19). Na sumaryczną liczbę 9232 sekwencji docelowych 8009 w pełni zawierało się w regionach genomu o wysokim poziomie ufności, 776 częściowo nakładało się na te regiony, zaś 447 nie nakładało się na sekwencję NIST. W rezultacie dla każdego powtórzenia uzyskano 1 831 483 współrzędnych do porównań. Rozpoznane nukleotydy niewariantowe zostały porównane z referencyjną sekwencją 19 genomu ludzkiego. Wyniki dokładności przedstawiono w punkcie [Zgodność wariantów somatycznych próbki linii komórkowej GM12878 z bazą danych NIST na stronie 66](#).

Tabela 24 Zgodność wariantów somatycznych próbki linii komórkowej GM12878 z bazą danych NIST

Próbka	Liczba uwzględnionych sekwencji docelowych	Zdolność rozpoznawania autosomów	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

W oparciu o dane dostarczone z 18 przebiegów analizy wariantów somatycznych aparatu Aparat NovaSeq 6000Dx jest w stanie powtarzalnie sekwencjonować:

- Zawartość GC \geq 20% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 1692 sekwencjonowanych amplikonów z 20% zawartością GC rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 0,34%).
- Zawartość GC \geq 86% (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych amplikonów z 86% zawartością GC rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 4,21%).
- Długości PoliA \leq 46 (14 550 082 z 14 550 083 nukleotydów rozpoznanych w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 46 powtórzeniami PoliA rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 4,18%)
- Długości PoliT \leq 40 (12 833 489 z 12 833 491 nukleotydów rozpoznanych w w 846 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 40 powtórzeniami PoliT rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 4,37%)
- Łańcuchy PoliG o długości \leq 11 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych amplikonach zawierających powtórzenie PoliG złożone z 11 nukleotydów zostały rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 7,59%).
- Długości PoliC \leq 8 (9405604 z 9405615 nukleotydów rozpoznanych w 5922 sekwencjonowanych obszarach docelowych z 8 powtórzeniami PoliC rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 4,68%)
- Powtórzenia dinukleotydomowe o długości \leq 31x (30996684 z 30996712 rozpoznane w 846 sekwencjonowanych amplikonach z 31-krotnym powtórzeniem dinukleotydu zostały rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 4,04%).
- Powtórzenia trinukleotydomowe o długości \leq 23x (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych amplikonach z 23-krotnym powtórzeniem trinukleotydu zostały rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 5,39%).
- Insercje o długości \leq 18 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych amplikonach z insercją 18-nukleotydomową zostały rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 1,44%).
- Delecje o długości \leq 21 (wszystkie rozpoznane nukleotydy w 846 sekwencjonowanych amplikonach zawierających delecję 21-nukleotydomową zostały rozpoznane prawidłowo, z odsetkiem nierozpoznanych nukleotydów na poziomie 7,86%).

Precyzja

Precyzję Aparatu NovaSeq 6000Dx oceniano przy użyciu próbek Platinum Genome w oznaczeniu reprezentatywnym mającym na celu rozpoznanie różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów w 23 różnych chromosomach przy użyciu 9232 oligonukleotydów docelowych. Oceniono łącznie 1723 docelowych małych wariantów (SNV, insercje i delecje). Badanie linii zarodkowej obejmowało jedenaście lub dwanaście powtórzeń czterech jednoznacznie zidentyfikowanych próbek Platinum Genome. Badanie linii somatycznej obejmowało jedenaście lub dwanaście powtórzeń czterech jednoznacznie zidentyfikowanych próbek Platinum Genome FFPE o różnych poziomach VAF. Biblioteki próbek przygotowano przy użyciu odczynników z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Badania przeprowadzono w jednej wewnętrznej lokalizacji przy użyciu trzech Aparatów NovaSeq 6000Dx, trzech partii Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, ver. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, ver. 1.5 (300 cykli) i z udziałem dwóch operatorów w ciągu sześciu dni początkowych. Dla każdego dnia początkowego biblioteki próbek linii zarodkowej były sekwencjonowane po jednej stronie urządzenia przy użyciu odczynników S2 i przepływu pracy analizy generacji Germline FASTQ i VCF z aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, a biblioteki próbek somatycznych po drugiej stronie urządzenia przy użyciu odczynników S4 i przepływu pracy analizy Somatic FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. W badaniu wykonano po 18 przebiegów dla przepływów pracy oznaczania wariantów linii zarodkowej i wariantów somatycznych.

Linia zarodkowa

W przypadku przebiegów linii zarodkowej lokalizacje genomowe, w których wykrywany jest docelowy wariant linii zarodkowej, są zgłaszane jako (wariant) dodatni. W przypadku spodziewanych dodatnich wariantów linii zarodkowej dokonywano oceny danych dotyczących odsetka braku rozpoznań i odsetka rozpoznań dodatnich (PPC) dla każdego rodzaju wariantu (SNV, insercja, delecja). W tabeli [Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje w zakresie rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu na stronie 68](#) podsumowano zaobserwowane odsetki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) dla każdego typu wariantu.

Tabela 25 Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje w zakresie rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania dodatnie ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insercja	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Delecja	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie dodatnie zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których wykrywany jest wariant.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Lokalizacje genomowe, w których nie wykryto wariantu docelowego, są zgłaszane jako ujemne (typ dziki).

W odniesieniu do spodziewanych ujemnych wyników oznaczeń wariantów dane oceniano w oparciu o odsetek braku rozpoznań i odsetek rozpoznań ujemnych (PNC). W tabeli [Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje w zakresie rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników ujemnych na stronie 69](#) podsumowano zaobserwowane wskaźniki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL).

Tabela 26 Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje w zakresie rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników ujemnych

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania ujemne ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Typ dziki	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie ujemne zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których nie wykrywa się żadnego wariantu.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Wkład każdego parametru (przyrząd, partia odczynnika, dzień, powtórzenia biblioteki) w ogólną zmienność określono na podstawie analizy składowych wariancji przy użyciu częstotliwości wariantu jako zmiennej odpowiedzi. Ogólne odchylenie standardowe wynosiło średnio 0,0370. Największym czynnikiem wpływającym na zmienność częstotliwości wariantów były powtórzenia przygotowań biblioteki, które reprezentowały 17,1% ogólnej zmienności. Dzień przyczynił się w 1%, podczas gdy przyrząd i partia odczynnika przyczyniły się do mniej niż 1% całkowitej zmienności [Precyzja w obrębie laboratorium – oszacowanie składowych zmienności dla częstotliwości wariantów próbek linii zarodkowej na stronie 69](#) (SD = odchylenie standardowe).

Tabela 27 Precyzja w obrębie laboratorium – oszacowanie składowych zmienności dla częstotliwości wariantów próbek linii zarodkowej

Element	Średnie SD	Średni % całkowitego SD
Dzień	0,0020	1,028
Aparat	0,0018	0,837
Partia materiałów eksploatacyjnych	0,0016	0,712
Powtórzenie biblioteki	0,0143	17,110
Łącznie	0,0370	100

Warianty somatyczne

W przypadku przebiegów somatycznych lokalizacje genomowe, w których wykrywany jest docelowy wariant somatyczny, są zgłaszane jako (wariant) dodatni. W przypadku rozcieńczonych próbek GM12877-13 i GM12878-13 z oczekiwanymi dodatnimi wariantami somatycznymi przy VAF pomiędzy 6,5% a 13%, dane zostały ocenione pod kątem wskaźnika braku rozpoznania i odsetka rozpoznań dodatnich (PPC) w obrębie każdego typu wariantu (SNV, insercja, delecja). W tabeli [Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje wykryć somatycznych dla oczekiwanych wyników dodatnich według typu wariantu \(VAF wynosi \$\geq 6,5\%\$ oraz \$\leq 13\%\$ \) na stronie 70](#) podsumowano zaobserwowane odsetki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) dla każdego typu wariantu.

Tabela 28 Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje wykryć somatycznych dla oczekiwanych wyników dodatnich według typu wariantu (VAF wynosi $\geq 6,5\%$ oraz $\leq 13\%$)

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania dodatnie ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insercja	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Delecja	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie dodatnie zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których wykrywany jest wariant.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Miejsca genomowe, w których nie wykryto docelowego wariantu somatycznego, są zgłaszane jako ujemne (typ dziki). W odniesieniu do spodziewanych ujemnych wyników oznaczeń wariantów dane oceniano w oparciu o odsetek braku rozpoznań i odsetek rozpoznań ujemnych (PNG). W tabeli [Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje wykryć somatycznych dla oczekiwanych wyników ujemnych na stronie 70](#) podsumowano zaobserwowane wskaźniki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) dla każdego rodzaju wariantu.

Tabela 29 Precyzja w obrębie laboratorium – obserwacje wykryć somatycznych dla oczekiwanych wyników ujemnych

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania ujemne ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Typ dziki	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie ujemne zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których nie wykrywa się żadnego wariantu.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx Illumina®

Wkład każdego parametru (przyrząd, partia odczynnika, dzień, powtórzenia biblioteki) w ogólną zmienność określono na podstawie analizy składowych wariacji przy użyciu częstotliwości wariantu jako zmiennej odpowiedzi. Ogólne odchylenie standardowe wynosiło średnio 0,0062. Powtórzenia przygotowań biblioteki pozostały najważniejszym źródłem zmienności, stanowiąc 50,7% zmienności całkowitej. Dzień, przyrząd i partia materiałów eksploatacyjnych przyczyniły się do mniej niż 1% zmienności całkowitej [Precyzja w obrębie laboratorium – oszacowanie składowych zmienności częstotliwości wariantów próbek somatycznych na stronie 71](#) (SD = odchylenie standardowe).

Tabela 30 Precyzja w obrębie laboratorium – oszacowanie składowych zmienności częstotliwości wariantów próbek somatycznych

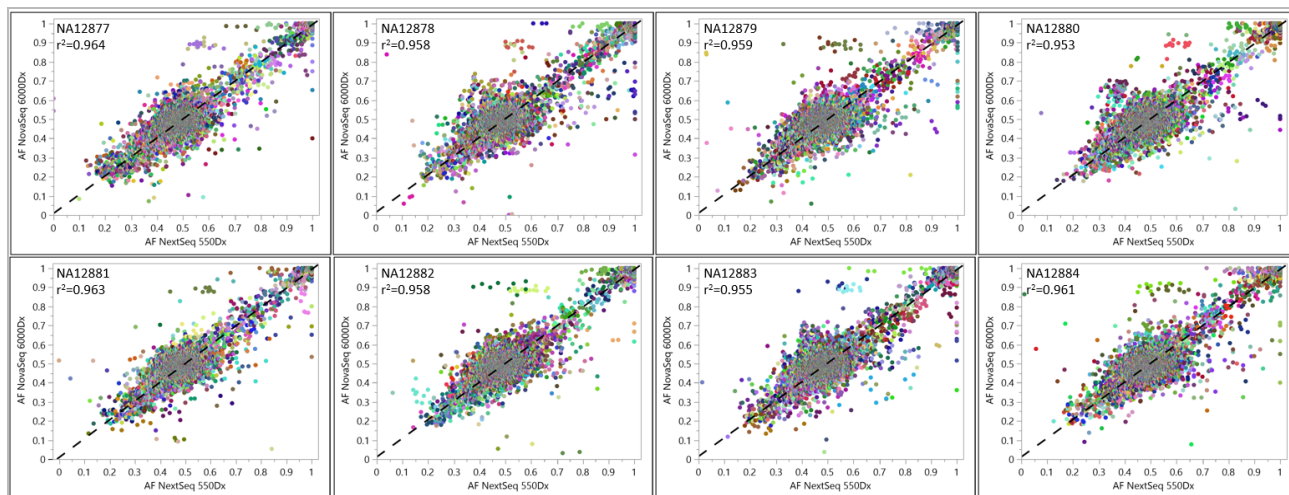
Element	Średnie SD	Średni % całkowitego SD
Dzień	0,0002	0,41
Aparat	0,0002	0,40
Partia materiałów eksploatacyjnych	0,0002	0,35
Powtórzenie biblioteki	0,0044	50,7
Łącznie	0,0062	100

Porównanie metod

Przeprowadzono badanie porównujące działanie przyrządów NovaSeq 6000Dx i NextSeq 550Dx. Zgodność częstotliwości wariantów dla próbek krwi oceniano za pomocą reprezentatywnego testu zaprojektowanego w celu zapytania o różne geny obejmujące 1 970 505 nukleotydów na wszystkich 23 ludzkich chromosomach. Przetestowano osiem próbek Platinum Genome DNA, siedem w sześciu powtórzeniach i jedną (NA12881) w pięciu powtórzeniach. Biblioteki zostały zsekwencjonowane w Aparat NovaSeq 6000Dx przy użyciu przepływu pracy z analizą Germline FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx oraz w urządzeniu NextSeq 550Dx przy użyciu modułu DNA Generate Dx Local Run Manager. [Wykresy korelacji częstotliwości wariantów \(punkty są oznaczone kolorem według jednoznacznie zidentyfikowanego wariantu. Warianty mogą być inaczej zabarwione na każdym wykresie\).](#) na stronie 72 Wykresy korelacji VAF między dwoma przyrządami dla każdej próbki. Na podstawie silnej korelacji między Aparat NovaSeq 6000Dx i NextSeq 550Dx stwierdzono, że cechy wydajności zależne od czynników przedanalizacyjnych (np. sposobów ekstrakcji czy substancji zakłócających) dotyczą obu tych przyrządów. Dodatkowe informacje można znaleźć w ulotce dołączonej do opakowania Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dxillumina®

Rysunek 15 Wykresy korelacji częstości wariantów (punkty są oznaczone kolorem według jednoznacznie zidentyfikowanego wariantu. Warianty mogą być inaczej zabarwione na każdym wykresie).



Odtwarzalność

Odtwarzalność oznaczeń z użyciem Aparatu NovaSeq 6000Dx oceniano przy użyciu próbek Platinum Genome w oznaczeniu reprezentatywnym mającym na celu rozpoznanie różnych genów obejmujących 1 970 505 nukleotydów w 23 różnych chromosomach przy użyciu 9232 oligonukleotydów docelowych. Oceniono łącznie 1723 docelowych małych wariantów (SNV, insercje i delecje). Badanie linii zarodkowej składało się z trzech lub czterech powtórzeń dwunastu jednoznacznie zidentyfikowanych próbek Platinum. Testy somatyczne obejmowały pięć lub sześć powtórzeń ośmiu poddanych jednoznacznie zidentyfikowanych próbek Platinum Genome FFPE o różnych poziomach VAF. Biblioteki próbek przygotowano przy użyciu odczynników z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Testy przeprowadzono w trzech zewnętrznych ośrodkach, używając po jednej partii Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S2, wer. 1.5 (300 cykli) i Zestaw odczynników NovaSeq 6000Dx S4, wer. 1.5 (300 cykli). W każdym ośrodku użyto jednego Aparatu NovaSeq 6000Dx. W każdym ośrodku badania wykonywało dwóch operatorów. Każdy operator przeprowadzał testy w trzech nienastępujących po sobie dniach początkowych dla każdego typu próbki łącznie dla 36 komór przepływowych w trzech ośrodkach. Dla każdego dnia początkowego biblioteki próbek linii zarodkowej były sekwencjonowane po stronie A urządzenia przy użyciu odczynników S2 i przepływu pracy analizy Germline FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, a biblioteki próbek somatycznych po stronie B urządzenia przy użyciu odczynników S4 i procedury analizy Somatic FASTQ i VCF generation w aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. W badaniu wykonano po 18 przebiegów dla przepływów pracy oznaczania wariantów linii zarodkowej i wariantów somatycznych.

Linia zarodkowa

W przypadku przebiegów linii zarodkowej lokalizacje genomowe, w których wykrywany jest docelowy wariant linii zarodkowej, są zgłaszane jako (wariant) dodatni. W przypadku spodziewanych dodatnich wariantów linii zarodkowej dokonywano oceny danych dotyczących odsetka braku rozpoznań i odsetka rozpoznań dodatnich (PPC) dla każdego rodzaju wariantu (SNV, insercja, delecja). W tabeli [Obserwacje rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu na stronie 73](#) podsumowano zaobserwowane odsetki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) dla każdego typu wariantu.

Tabela 31 Obserwacje rozpoznań wariantów linii zarodkowej dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania dodatnie ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insercja	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Delecja	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie dodatnie zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których wykrywany jest wariant.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Lokalizacje genomowe, w których nie wykryto wariantu docelowego, są zgłaszane jako ujemne (typ dziki). W odniesieniu do spodziewanych ujemnych wyników oznaczeń wariantów dane oceniano w oparciu o odsetek braku rozpoznań i odsetek rozpoznań ujemnych (PNC). W tabeli [Obserwacje rozpoznań linii zarodkowej dla spodziewanych wyników ujemnych na stronie 73](#) podsumowano zaobserwowane wskaźniki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL).

Tabela 32 Obserwacje rozpoznań linii zarodkowej dla spodziewanych wyników ujemnych

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania ujemne ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Typ dziki	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie ujemne zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których nie wykrywa się żadnego wariantu.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Warianty somatyczne

W przypadku przebiegów somatycznych lokalizacje genomowe, w których wykrywany jest docelowy wariant somatyczny, są zgłaszane jako (wariant) dodatni. W przypadku spodziewanych dodatnich wariantów somatycznych, w których średnia częstotliwość występowania alleli wariantu (VAF) jest większa lub równa 14% i mniejsza lub równa 28%, dane zostały ocenione pod kątem odsetka braku rozpoznania i odsetka rozpoznań dodatnich (PPC) w każdym typie wariantu (SNV, insercja, delecja). W tabeli [Obserwacje rozpoznań somatycznych dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu \(średni VAF \$\geq\$ 14% oraz \$\leq\$ 28%\) na stronie 74](#) podsumowano zaobserwowane odsetki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) dla każdego typu wariantu.

Tabela 33 Obserwacje rozpoznań somatycznych dla spodziewanych wyników dodatnich w zależności od typu wariantu (średni VAF \geq 14% oraz \leq 28%)

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania dodatnie ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insercja	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Delecja	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie dodatnie zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których wykrywany jest wariant.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Miejsca genomowe, w których nie wykryto docelowego wariantu somatycznego, są zgłaszane jako ujemne (typ dziki). W odniesieniu do spodziewanych ujemnych wyników oznaczeń wariantów dane oceniano w oparciu o odsetek braku rozpoznań i odsetek rozpoznań ujemnych (PNG). W tabeli [Obserwacje rozpoznań somatycznych dla spodziewanych wyników ujemnych na stronie 74](#) podsumowano zaobserwowane odsetki wraz z obliczonymi metodą punktacji Wilsona górnymi i dolnymi granicami przedziału ufności 95% (LCL/UCL) w każdym rodzaju wariantu.

Tabela 34 Obserwacje rozpoznań somatycznych dla spodziewanych wyników ujemnych

Typ wariantu	Brak zaobserwowanych rozpoznań ¹	Łączna liczba rozpoznań	Odsetek braku rozpoznań	Zaobserwowane rozpoznania ujemne ²	Łączna liczba możliwych do oceny rozpoznań	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Typ dziki	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Brak rozpoznania zdefiniowany jako docelowa pozycja chromosomowa, w której nie można określić wariantu (ze względu na niewielką głębokość pokrycia).

² Rozpoznanie ujemne zdefiniowane jako docelowe pozycje chromosomów, w których nie wykrywa się żadnego wariantu.

³ Dwustronny przedział ufności 95% obliczono metodą punktacji Wilsona.

Historia wersji

Dokument	Data	Opis zmiany
Nr dokumentu: 200025276, wer. 01	Wrzesień 2022 r.	Zaktualizowano dane precyzji dla obserwacji rozpoznania linii zarodkowej.
Nr dokumentu: 200025276, wer. 00	Sierpień 2022 r.	Pierwsze wydanie.

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2022 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem www.illumina.com/company/legal.html.

Dane do kontaktu



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Holandia

Sponsor australijski

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w legendzie symboli dostępnej na stronie support.illumina.com, na karcie *Documentation* (Dokumentacja) dla danego zestawu.