

Pakendi infoleht

KASUTAMISEKS IN VITRO DIAGNOSTIKAS AINULT EKSPORDIKS

Kasutusotstarve

NovaSeq 6000Dx seade on ette nähtud DNA teekide sekveneerimiseks, kui kasutatakse *in vitro* diagnostilisi (IVD) analüüsidega. NovaSeq 6000Dx seade on ette nähtud kasutamiseks koos spetsiifiliste registreeritud, sertifitseeritud või heakskiidetud IVD reagentide ja analüütilise tarkvaraga.

Protseduuri põhimõtted

Seade Illumina® NovaSeq 6000Dx seade on ette nähtud kasutamiseks DNA teekide sekveneerimiseks *in vitro* diagnostiliste analüüsidega. Seade NovaSeq 6000Dx kasutab sisendina teekke, mis on loodud DNA-st, mille puhul proovide indeksid ja kinnistusjärjestused lisatakse amplifitseeritud sihtmärkidele. Proovide teegid kinnistatakse läbivooluküvetile ja sekveneeritakse seadmes sünteesi teel sekveneerimise (sequencing by synthesis, SBS) meetodiga. SBS-meetod kasutab pöörduvat terminaatorit, et tuvastada fluorestsentsmärgistusega üksiknukleotiidi alused nende inkorporeerimisel kasvavatesse DNA-ahelatesse. Reaalajas analüüsi (RTA) tarkvara analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekveneerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Kui esmane analüüs lõpeb, saab seadmel Illumina DRAGEN Server NovaSeq 6000Dx jaoks käivitada sekundaarse analüüsi aluse nimetuste töötlemiseks. Seade NovaSeq 6000Dx kasutab töövoost olenevalt erinevaid sekundaarse analüüsi mooduleid. DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx moodulis sisaldab töötlemine demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joondamist, variandi nimetamist ja variandi nimetuste vormingufailide (VCF ja gVCF) loomist. VCF- ja gVCF-failid sisaldavad teavet iduliini või somaatiliste variantide (sõltuvalt valitud töövoost) kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel.

Kahekordne töörežiim

NovaSeq 6000Dx sisaldab üheainsa käivitusega kõvaketta eraldi *in vitro* diagnostika (IVD) ja ainult uuringukasutuse (RUO) režiimidega. Režiim valitakse kuval Sequencing (sekveneerimine) oleva lülitiga. Valitud režiim on liideses kõigil kuvadel selgelt märgistatud. IVD sekveneerimisanalüüsid, sealhulgas DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakendus kas mikrolüüsi ja/või somaatilistes töövoogudes, viiakse läbi IVD-režiimis. IVD-režiimis saab kasutada ainult IVD sekveneerimise reagente. Jõudluse karakteristikud ja protseduuri piirangud rakenduses NovaSeq 6000Dx on IVD-režiimis DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakendusega kindlaks tehtud.

Protseduuri piirangud

1. Ainult *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks.

2. Kui DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakendust kasutatakse koos seadmega NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) ja NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli), on see on võimeline edastama:
 - Sekveneerimise väljund:
 - $\geq 1,0$ terabaasi (TB) koos S2 komplektiga
 - $\geq 3,0$ TB koos S4 komplektiga
 - lugemi pikkust (paaritulemuse käituses) 2×150 aluspaari (bp)
 - Alused suuremad kui $Q30 \geq 85\%$ lugemispikkusel 2×150 bp. 85% või rohkem alusnimetamistest on Phredi skaala kvaliteediskoorid suuremad kui 30, mis näitavad aluse nimetuse täpsust $99,9\%$
3. Pikkusega > 18 bp insertioonid ja pikkusega > 21 bp deletsioonid ei ole valideeritud.
4. Suuri variante, sealhulgas mitmenukleotiidsid variante (MNV-d) ja suuri indeleid, võidakse VCF-väljundfailis märkida eraldi väiksemate variantidena.
5. Väikesed MNV-d esitatakse väljund-VCF-failis eraldi variantidena.
6. Deletsioone märgitakse VCF-is eelmise aluse koordinaadis VCF-vormingu kohaselt. Seega kaaluge läheduses olevaid variante, enne kui märgite, et konkreetse aluse nimetus on homosügootne referents.
7. Mooduli Germline piirangud:
 - Rakenduse NovaSeq 6000Dx Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu kasutamine DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on loodud pakkuma kvalitatiivseid tulemusi iduliini variantide (nt homosügootne, heterosügootne, metsik tüüp) nimetamiseks.
 - Koopiaarvu variatsioon võib mõjutada seda, kas variant tuvastatakse homosügoodi või heterosügoodina.
 - Süsteem ei esita ühes lookuses rohkem kui kahte varianti, isegi koopiade arvu variatsiooni korral.
8. Mooduli Somatic piirangud:
 - NovaSeq 6000Dx Rakenduse Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu rakenduses DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutamine on ette nähtud pakkuma kvalitatiivseid tulemusi somaatiliste variantide (s.t somaatiliste variantide olemasolu) nimetamiseks.
 - Somaatiline FASTQ ja VCF-i genereerimise analüüsi töövoogu ei suuda eristada iduliini ja somaatilisi variante. Moodul on ette nähtud variantide tuvastamiseks eri variantide sageduste seast, kuid variandi sagedust ei saa kasutada iduliini variantide ja somaatiliste variantide eristamiseks.
 - Proovis sisalduv normaalne kude mõjutab variantide tuvastamist. Kirjeldatud avastamispiir põhineb variandi sagedusel võrreldes kogu DNA-ga, mis on võetud nii kasvajasest ja normaalsest koest.
 - Kui samas lookuses nimetatakse rohkem kui üks variantalleel, ei esitata ühtki alleeli läbivate variantidena. Selle asemel esitatakse alleelide täielik komplekt, kuid filtreeritakse läbi multialleelsildi.

Kvaliteedikontrolli protseduurid

Tarkvara NovaSeq 6000Dx hindab iga käitust, proovi ja aluse nimetust, võrreldes neid kvaliteedikontrolli moodsusega. Positiivseid ja negatiivseid kontrollmaterjale on soovitatav kasutada ka teekide ettevalmistamises ja neid tuleb hinnata. Hinnake kontrollmaterjale järgmiselt.

- Negatiivne kontrollmaterjal (malli kontrollmaterjal puudub) või muu negatiivne kontrollmaterjal — peab andma eeldatava tulemuse. Kui negatiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises, indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud või tekkinud on saastumine.
- Positiivne kontrollproov — peab andma eeldatava tulemuse. Kui positiivne kontrollmaterjal annab tulemuse, mis erineb eeldatavast, on võimalik, et tekkinud on viga proovi jälgimises või indekseerimispraimerid on valesti jäädvustatud.

Toote komponendid

illumina NovaSeq 6000Dx koosneb järgmistest osadest:

1. NovaSeq 6000Dx seade (Katalooginumber 20068232)
2. Seadme NovaSeq 6000Dx seade tarkvara komponendid sisaldavad järgmist:

Tarkvararakendus	Paigalduse asukoht	Funktsioon	Kirjeldus
Operatsioonitarkvara NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Juhib seadme tööd	Tarkvararakendus Operatsioonitarkvara NovaSeq (NVOS) juhib seadme tööd sekveneerimise ajal ja loob kujutised, mida saab kasutada reaajas analüüsi (Real-Time Analysis, RTA) tarkvaras.
Reaajas analüüsi tarkvara (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Teeb esmase analüüsi	RTA tarkvararakendus teisendab rakenduses NVOS loodud kujutised sekveneerimiskäituse tsükli iga paani jaoks alusfailidesse. Alusfailid on sisendid rakenduse moodulitele rakenduses illumina DRAGEN Server NovaSeq 6000Dx jaoks. RTA tarkvararakendus ei sisalda kasutajaliidest.
illumina käivitushaldur	illumina DRAGEN Server	Kontrollib käituse seadistamist ja haldamist	illumina käivitushaldur võimaldab kasutajate ja seadme haldamist, majutab rakenduse tarkvara ja võimaldab DRAGEN-i riistvara kasutamist, et kiirendada genoomika sekundaaranalüüsi moodulites.

Tööttingimused

Lisateavet tööttingimuste kohta vaadake *NovaSeq 6000Dx seadme toote dokumentatsioon* jaotisest „Keskkonnakaalutlused”.

Mõjur	Spetsifikatsioon
Temperatuur	Hoidke labori temperatuuri vahemikus 19 °C kuni 25 °C (22 °C ± 3 °C). See temperatuur on seadme töötemperatuurivahemik. Töösükli ajal püüdke hoida püsivat ruumitemperatuuri, mis ei muutuks rohkem kui ±2 °C.
Õhuniiskus	Hoidke suhtelist õhuniiskust vahemikus 20–80% (mittekondenseeruv). Süsteemi tuleb kasutada töökõrgusel 2000 meetrit või vähem.

Kulutarvikud ja vahendid

Selles jaotises on loetletud kõik, mis on vajalik NovaSeq 6000Dx sekveneerimistsükliks. See hõlmab Illumina tarnitavaid kulutarvikuid ja abitarvikuid ning seadmeid, mida peate ostma teistelt tarnijatelt. Need esemed on vajalikud uuringuplaani täitmiseks ning hooldus- ja veaotsingu protseduuride läbiviimiseks.

Teavet tarvikute või pakendi sümbolite kohta vt [Illumina IVD sümboli võti \(dokument nr 1000000039141\)](#).

Sekveneerimise kulutarvikud

NovaSeq 6000Dx kasutamiseks on vaja järgmisi komponente.

- Puhverkassett
- Klastrikassett
- Läbivooluküvett
- Teegikatsuti
- SBS-kassett

NovaSeq 6000Dx kulutarvikud on pakitud järgmistesse konfiguratsioonidesse. Iga komponent kasutab kulutarvikute täpseks jälgimiseks ja ühilduvuseks raadiosagedustuvastust (RFID).

tabel 1 Illuminatarnitud kulutarvikud

Komplekti nimi	Sisu	Illumina Katalooginumber
NovaSeq 6000Dx S2 reagendi v1.5 komplekt (300 tsükli)	S2 klastrikassett S2 läbivooluküvett S2 SBS-kassett	20046931

Komplekti nimi	Sisu	illumina Katalooginumber
NovaSeq 6000Dx S4 reagendi v1.5 komplekt (300 tsüklit)	S4 klastrikassett S4 läbivooluküvett S4 SBS-kassett	20046933
NovaSeq 6000Dx S2 puhverkassett	S2 puhverkassett	20062292
NovaSeq 6000Dx S4 puhverkassett	S4 puhverkassett	20062293
NovaSeq 6000Dx teegikatsuti	Üks teegikatsuti	20062290
NovaSeq 6000Dx teegikatsuti, 24 tk	24 teegikatsutit	20062291

Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange komponendid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

tabel 2 NovaSeq 6000Dx komplekti hoiustamine

Kulutarvik	Kogus	Säilitustemperatuur	Pikkus	Laius	Kõrgus
Läbivooluküvett	1	2 °C kuni 8 °C	27,7 cm (10,9 tolli)	17 cm (6,7 tolli)	3,8 cm (1,5 tolli)
Klastrikassett	1	-25 °C kuni -15 °C	29,5 cm (11,6 tolli)	13 cm (5,1 tolli)	9,4 cm (3,7 tolli)
SBS-kassett	1	-25 °C kuni -15 °C	30 cm (11,8 tolli)	12,4 cm (4,9 tolli)	11,2 cm (4,4 tolli)
Puhverkassett	1	15 °C kuni 30 °C	42,2 cm (16,6 tolli)	20,6 cm (8,1 tolli)	21,1 cm (8,3 tolli)
Teegikatsuti	1	15 °C kuni 30 °C	4,1 cm (1,6 tolli)	2,3 cm (0,9 tolli)	12,4 cm (4,9 tolli)

Kulutarvikute üksikasjad

Ühilduvate komplekti komponentide tuvastamiseks on läbivooluküvettidel ja kassettidel komplekti režiimi näitavate sümbolitega sildid.

tabel 3 Komplekti ühilduvuse märgistus

Komplekti režiim	Sildi märgistus	Kirjeldus
S2 komplekti komponendid	S2	S2 läbivooluküvett genereerib kuni 4,1 miljardit üksikut lugemit läbivat filtrit väljundvõimsusega kuni 1000 Gb kiirusel 2 x 150 bp. S2 läbivooluküvett tagab kiire sekveneerimise enamikus suure läbilaskevõimega rakendustes.
S4 komplekti komponendid	S4	S4 läbivooluküvett genereerib kuni 10 miljardit üksikut lugemit läbivat filtrit väljundvõimsusega kuni 3000 Gb kiirusel 2 x 150 bp. S4 läbivooluküvett on nelja rajaga läbivooluküveti versioon, mis on loodud maksimaalse väljundvõimsuse saavutamiseks.

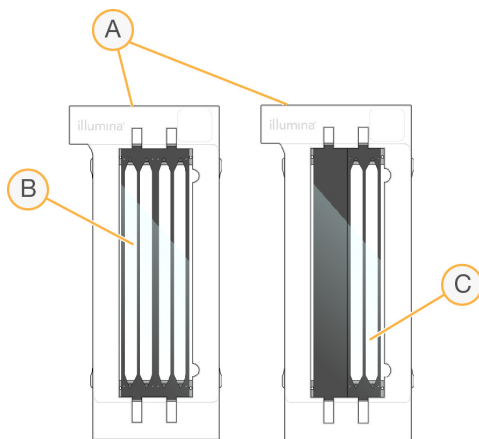
Läbivooluküvett

NovaSeq 6000Dx on muustriga läbivooluküvett, mis asub kassetis. Läbivooluküvett on klaaspõhine alusmaterjal, mis sisaldab kindlas järjekorras miljardeid nanosüvendeid. Nanosüvendites luuakse klastrid, millest seejärel teostatakse sekveneerimine.

Igal läbivooluküvetil on mitu rada ühendatud teekide sekveneerimiseks. S2 läbivooluküvetil on kaks rada ja S4 läbivooluküvetil neli rada. Iga rada kuvatakse mitmes vaalus ja seejärel jagab tarkvara iga vaalu kujutise väiksemateks osadeks, mida nimetatakse paanideks.

Mõned kriimustused ja muud väiksemad kosmeetilised defektid läbivooluküvetil on normaalsed ega mõjuta eeldatavalt andmete kvaliteeti ja saagist. Illumina soovib kasutada neid läbivooluküvette tavapäraselt.

joonis 1 Läbivooluküvetid



- A. Läbivooluküveti kassett
- B. Neljarajaline läbivooluküvett (S4)
- C. Kaheajaline läbivooluküvett (S2)

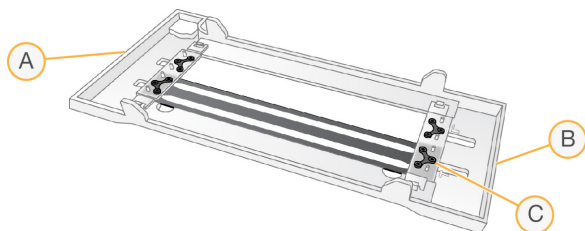
Iga läbivooluküveti alumisel poolel on mitu tihendit. Teegid ja reagentid sisenevad läbivooluküveti radadele sissevoolukambri otsa vahetihendite. Kasutatud reagentid väljutatakse radadelt läbi väljalaskeava otsas olevate tihendite.



ETTEVAATUST!

Vältige tihendite puudutamist läbivooluküveti käsitlemisel.

joonis 2 Ümberpööratud läbivooluküvett



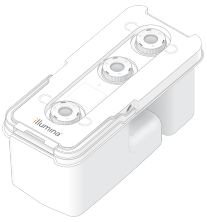
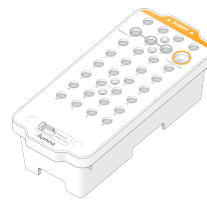
- A. Väljalaske ots
- B. Sisselaske ots
- C. Tihend (üks neljast)


Puhvri, klastri ja SBS-kasseti üksikasjad

Puhvri-NovaSeq 6000Dx, klastri- ja SBS- kassetidel on fooliumtihendiga mahutid, mis on eeltäidetud reagentide, puhvrite ja pesulahusega. Reagentikomplektidega NovaSeq 6000Dx on kaasas klastri ja SBS-i kassetid. Puhverkassetti müüakse eraldi.

Kassetid laaditakse otse seadmesse ning need on laadimisvigade vähendamiseks värvkodeeritud ja märgistatud. Juhikud reagenti jahutis ja puhvrisahtlites tagavad õige suuna.

tabel 4 NovaSeq 6000Dx Kassetid

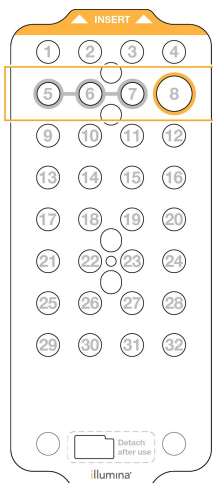
Kulutarvik	Kirjeldus
 Puhverkassett	Eeltäidetud sekveneerimispuhvritega ja kaalub kuni 6,8 kg (15 naela). Plastist käepide lihtsustab kandmist, laadimist ja mahalaadimist. Puhvrikassett sisaldab reagente, mis on valguse suhtes tundlikud. Hoidke puhvermahutit kuni kasutamiseni pakendatuna.
 Klastrikassett	Täidetud klastrite, indekseerimise ja paarisotsaliste reagentide ja pesulahusega. Sisaldab teegikatsuti jaoks määratud asendit. Oranž märgistus eristab klastrikassetti SBS-kassetist. Asendis #30 olev denaturatsioonireagent sisaldab formamiidi, mis on orgaaniline amiid ja reproduktiivtoksiin. Mis tahes kasutamata reagenti ohutu utiliseerimise hõlbustamiseks sekveneerimiskäituse järgselt on mahuti eemaldatav.

Kulutarvik	Kirjeldus
 SBS kassett	<p>Eeltäidetud sekvenerimisreagentidega sellistes kogustes, mis vastavad tsükli arvule, mida komplekt toetab. Kõigil reagenti kolmel asendil on kõrvuti asuv asend, mis on reserveeritud automaatseks käitusjärgseks pesemiseks. Hall märgistus eristab SBS kasseti klastrikassetist.</p> <p>SBS-kassett sisaldab reagente, mis on valguse suhtes tundlikud. Hoidke SBS-konteiner kuni kasutamiseni pakendis.</p>

Reserveeritud klastrikasseti mahutid

Kohandatud praimerite jaoks on reserveeritud kolm mahutit ja teegikatsuti jaoks tühi asend. Proovide jälgitavuse tagamiseks laaditakse teegikatsuti tsükli seadistamise ajal klastrikasseti ja see jääb kasseti kuni käituse lõpuni.

joonis 3 Nummerdatud mahutid



tabel 5 Klastrikasseti mahutid

Asend	Reserveeritud
5, 6 ja 7	Valikulised kohandatud praimerid
8	Teegikatsuti

Kasutaja hangitavad kulutarvikud ja seadmed

tabel 6 Kulutarvikud

Kulutarvik	Tarnija	Otstarve
Tsentrifuugipudel, 500 ml	Tavapärane laboritarvete tarnija	Tween 20 lahjendamine hoolduspesuks.
Tsentrifuugi katsuti, 30 ml	Tavapärane laboritarvete tarnija	NaOCl-i lahjendamine hoolduspesuks.
Ühekordsed kindad, talgita	Tavapärane laboritarvete tarnija	Üldotstarbeks.
70% isopropüülalkoholiga puhastuslapid või etanoolalkoholi lapid, 70%	VWR, kataloogi nr 95041-714 või sarnane toode Tavapärane laboritarvete tarnija	Komponentide puhastamine enne käitust ja üldotstarbeline.
Vähe kiude sisaldavad laborisalvrätid	VWR, kataloogi nr 21905-026 või sarnane toode	Läbivooluküveti etapi kuivatamine ja üldotstarbeline kasutus.
Reagendi klassi NaOCl, 5%	Sigma-Aldrich, kataloogi nr 239305	Hoolduspesu teostamine.
Pipetiotsakud, 2 µl	Tavapärane laboritarvete tarnija	Teekide lahjendamise ja laadimise pipetid.
Pipetiotsakud, 20 µl	Tavapärane laboritarvete tarnija	Teekide lahjendamise ja laadimise pipetid.
Pipetiotsakud, 200 µl	Tavapärane laboritarvete tarnija	Teekide lahjendamise ja laadimise pipetid.
Pipetiotsakud, 1000 µl	Tavapärane laboritarvete tarnija	Teekide lahjendamise ja laadimise pipetid.
Reagendi või spektrofotomeetrilise klassi isopropüülalkohol (99%), 100 ml pudel	Tavapärane laboritarvete tarnija	Optikakomponentide regulaarne puhastamine ja objektiivse puhastamise kassetti toetamine.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalooginr P7949	Hoolduspesu teostamine.
Vesi, laborikvaliteediga	Tavapärane laboritarvete tarnija	Tween 20 ja naatriumhüpokloriti lahjendamine hoolduspesuks.

tabel 7 Seadmed

Toode	Päritolu
Sügavkülmik, -25 °C kuni -15 °C	Tavapärase laboritarvete tarnija
Gradueeritud silinder, 500 ml, steriilne	Tavapärase laboritarvete tarnija
Jäänõu	Tavapärase laboritarvete tarnija
Pipett, 20 µl	Tavapärase laboritarvete tarnija
Pipett, 200 µl	Tavapärase laboritarvete tarnija
Pipett, 1000 µl	Tavapärase laboritarvete tarnija
Külmkapp, 2 °C kuni 8 °C	Tavapärase laboritarvete tarnija
Anum, veevannid*	Tavapärase laboritarvete tarnija

* Kasutage anumad, kuhu mahuvad kaks reagentikassetti ja vastav veetase. Näiteks (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm)(24 tolli × 36 tolli × 10 tolli).

Juhised laborivee jaoks

Seadmega töötamiseks kasutage alati laborikvaliteediga või deioniseeritud vett. Ärge mitte kunagi kasutage kraanivett. Kasutage ainult järgmise kvaliteediga vett või selle ekvivalente:

- Deioniseeritud vesi
- Illumina PW1
- 18-megaoomine (MΩ) vesi
- Milli-Q vesi
- Super-Q vesi
- Molekulaarbioloogias kasutatava puhtusastmega vesi

Kasutusjuhised

Järgmised juhised on ette nähtud NovaSeq 6000Dx seade kasutamiseks IVD-režiimis, kasutades komplekti S2 või S4 komplekti konfiguratsioone.

Sekvenerimiskäituse loomine

Kasutage järgmisi samme käituse loomiseks seadmel Illumina käivitushaldur IVD või RUO režiimis. Teise võimalusena valige lehe Runs (Käitused) vahekaardilt Planned (Plaanitud) suvand **Import Run** (Impordi käitus). Looge seadmes või võrguühendusega arvuti brauseri kaudu seadmesse Illumina käivitushaldur sisenedes uued käitused.

MÄRKUS. Iga analüüsirakenduse jaoks vajalik täpne teave on erinev, kuid käituse loomise protsess hõlmab järgmisi samme.

1. Valige kuva Runs (Käitused) vahekaardil Planned (Plaanitud) käsk **Create Run** (Loo käitus).
2. Valige rakendus ja seejärel valige **Next** (Järgmine).
3. Jätkake sätete kuvadel. Sõltuvalt rakendusest võivad kuvatavad kuvad sisaldada järgmist.
 - **Run Settings** (Käituse sätted) – sisestage käituse parameetrid.
 - **Sample Data** (Proovi andmed) – sisestage proovi andmed käsitsi või importides CSV-fail, mis sisaldab proovi teavet. Proovide nimed peavad olema unikaalsed.
 - **Analysis settings** (Analüüsi sätted) – sisestage analüüsi sätted.
4. Vaadake üle ekraanil Review (Ülevaade) käituse teave ja valige **Save** (Salvesta). Käitus lisatakse käituste loendi ülaossa vahekaardil Planned (Plaanitud).

Kulutarvikute ettevalmistamine

Sulatage SBS ja klasterkassetid

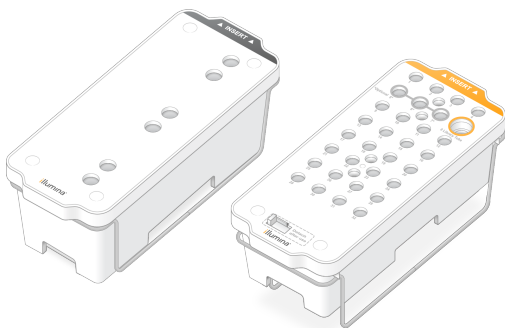


ETTEVAATUST!

Kuuma vee kasutamine reagentide sulatamiseks võib põhjustada andmekvaliteedi halvenemise või käitamise nurjumise.

1. Kui sekveneerimiskäitus on pooleli, veenduge, et seadme mõlemad küljed oleks sulatamise lõpetamisel saadaval.
2. Võtke SBS ja klasterkassetid temperatuuriga -25 °C kuni -15 °C hoiukohast välja.
3. Asetage iga kassett traatsulatusrestile.
Restid on seadmega kaasas ja väldivad kasseti ümberminekut veevannis.

joonis 4 Kassetid traatsulatusrestidel



4. Kasutage sulatamise kestuse määramiseks järgmist tabelit.

Sulatage SBS ja klastrikassetid toatemperatuuril (19 °C kuni 25 °C) veevannis järgmiselt. Kastke kassette umbes poolenisti.

Kassett	Sulatamise kestus
S2 SBS-kassett	4 tundi
S2 klastrikassett	Kuni 2 tundi
S4 SBS kassett	4 tundi
S4 klastrikassett	Kuni 4 tundi



ETTEVAATUST!

Kui sekveneerimist ei alustata nelja tunni jooksul pärast reagendikassetide sulatamist, võib see põhjustada andmekvaliteedi halvenemist.

5. Kuivatage kasseti alused põhjalikult paberrätikutega. Kuivatage süvendite vahelt, et kogu vesi eemaldada.
6. Kontrollige, et fooliumtihenditel ei oleks vett. Vee esinemisel kuivatage see ebamevaba lapiga.
7. Kontrollige iga kasseti põhja, veendumaks, et mahutid on jäävabad, mis tähendab, et reagendid on üles sulanud.
8. Pöörake iga kassetti reagentide segamiseks kümme korda ümber.



ETTEVAATUST!

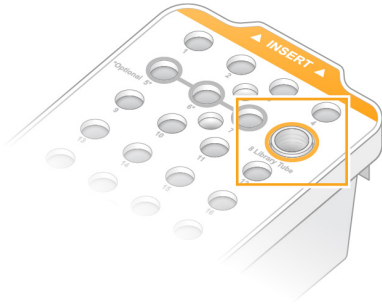
Kui kassette ei pöörata korrektselt ümber, võib see põhjustada andmekvaliteedi halvenemist.

9. Õhumullide vähendamiseks koputage iga kasseti põhja õrnalt vastu töölauda.

Teegikatsuti laadimine

- Ilma alumist teeki segamata sisestage korgita teegikatsuti, mis sisaldab denatureeritud ja lahjendatud teegi puuli, klastrikasseti **teegikatsuti** positsiooni (#8).
- Sisestage teegikatsuti klastrikasseti positsiooni nr 8.

joonis 5 Korgita teegikatsuti positsioonis nr 8

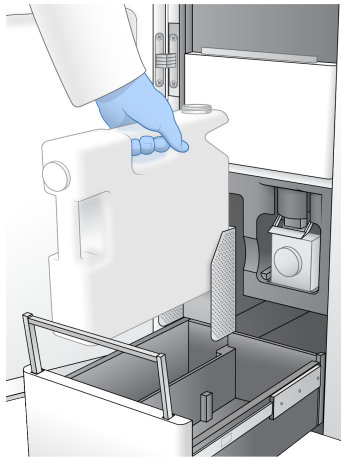


Kasutatud reagentipudelite tühjendamine

Kasutage järgmisi juhiseid, et tühjendada kasutatud reagentipudelid *iga* sekveneerimistsükli järel. Kui teie süsteem on konfigureeritud selliselt, et kasutatud reagentid suunatakse väljapoole, kogub väike pudel kasutatud reagentid kokku ja seda tuleb tühjendada iga sekveneerimistsükli järel. Suur pudel peab olema paigas.

1. Eemaldage ja tühjendage väike kasutatud reagentipudel järgmiselt.
 - a. Tõstke hoob üles ja eemaldage väike kasutatud reagentipudel süvendist. Võtke pudeli külgedest kinni.
 - b. Eemaldage korgihoidjalt pudeli esiküljel olev keermestatud kork.
 - c. Sulgege pudeli ava korgiga, et vältida mahavalgumist.
 - d. Hoidke sisu teise pudeli sisust eraldi ja utiliseerige see vastavalt teie piirkonna kehtivatele standarditele.
 - e. Pange korgita pudel tagasi süvendisse ja seejärel langetage hoob. Hoidke korki hoidikul.
2. Eemaldage ja tühjendage suur kasutatud reagentipudel järgmiselt.
 - a. Eemaldage ülemist käepidet kasutades suur kasutatud reagentipudel puhvrisahtli vasakult küljelt.
 - b. Eemaldage korgihoidjalt pudeli esiküljel olev keermestatud kork.
 - c. Sulgege pudeli ava korgiga, et vältida mahavalgumist.
 - d. Utiliseerige sisu vastavalt teie piirkonna kehtivatele standarditele. Hoidke tühjendamisel mõlemast käepidemest kinni.
 - e. Pange korgita pudel tagasi puhvrisahtlisse. Hoidke korki hoidikul.

joonis 6 Tühja pudeli tagastamine



3. Pange kätte uus paar talgita kindaid.

**ETTEVAATUST!**

Pärast kasutatud reagentpudeli käsitlemist pange alati kätte uus paar kindaid.

4. Sulgege puhvrisahtel ja seejärel sulgege vedelikusektsiooni luugid.

**ETTEVAATUST!**

Kasutatud reagentpudelite tühjendamata jätmine võib põhjustada käituse katkemise ja ületäitumise, mis kahjustab seadet ja toob kaasa ohutusrisiki.

Läbivooluküveti ettevalmistamine

1. Võtke läbivooluküveti karp 2 °C kuni 8 °C hoiuruumist välja.
2. Asetage suletud läbivooluküveti pakend 10-15 minutiks ruumi, mille temperatuur on 19 °C kuni 25 °C. Kasutage läbivooluküvetit 12 tunni jooksul pärast selle pakendist väljavõtmist.

Kulumaterjalide laadimine

Käituse seadistamise alustamiseks ja kulutarvikute laadimiseks järgige alltoodud juhiseid.

1. Valige peamenüüst Sequence (**Järjestus**) ja seejärel valige ühe või kahe läbivooluküvetiga seeria järgmiselt.
 - **A+B** – seadistage kahe läbivooluküvetiga käitus.
 - **A** – seadistage üks läbivooluküvetit, et käitada seda küljel A.
 - **B** – seadistage üks läbivooluküvetit, et käitada seda küljel B.Süsteem käivitab käituse seadistuse, alustades läbivooluküveti laadimisest.
2. Valige **OK** (Korras) hoiatuse kinnitamiseks ja avage läbivooluküveti luuk.

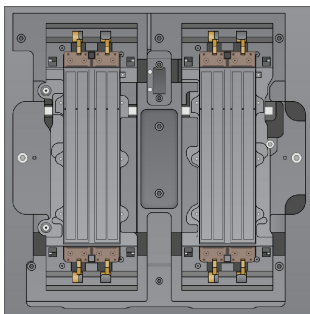
**ETTEVAATUST!**

Sekveneerimistsükli ajal hoidke pind vaba ja vältige seadmele toetumist. Läbivooluküveti uksele avalduv rõhk võib põhjustada selle avanemist, mis peatab käituse. Peatatud käitusi ei saa jätkata.

Läbivooluküveti laadimine

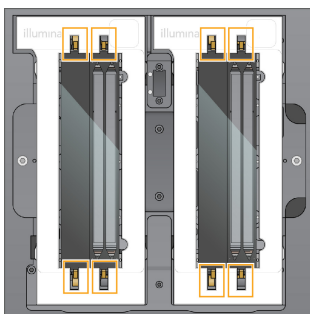
1. Eemaldage eelmise käituse läbivooluküvett, kui see on veel kohal.
2. Kui läbivooluküveti etapis on näha osakesi, puhastage kogu etapp, sealhulgas vedelikliides ja optilise joonduse sihtmärgi klaaspind, alkoholiga immutatud lapiga. Kuivatage ebemevaba lapiga.

joonis 7 Läbivooluküveti etapp



3. Eemaldage läbivooluküvett fooliumpakendist toimides järgnevalt.
 - a. Pange kätte uus talgita kinnaste paar, et vältida läbivooluküveti klaaspinna saastumist.
 - b. Kui pakend on tasasel pinnal, tõmmake foolium nurgasakilt lahti.
 - c. Eemaldage läbivooluküveti kattev läbipaistev plastikust hoidik.
 - d. Eemaldage läbivooluküvett pakendist. Hoidke läbivooluküveti külgedelt, et vältida klaasi või alumise külje tihendite puudutamist.
 - e. Kui ühel kahest klaaspinnast on nähtavaid osakesi, puhastage vastav pind ebemevaba alkoholilapiga ja kuivatage väheste ebemetega laborikoega.
 - f. Kõrvaldage pakend kasutusest nõuetekohaselt.
4. Joondage läbivooluküvett nelja tõstetud klambriga ja asetage see läbivooluküveti etapile.

joonis 8 Laaditud läbivooluküvetid joondatud klambrite kohal

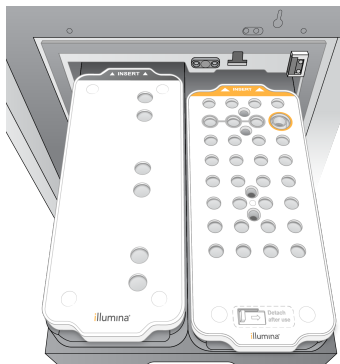


5. Valige **Close Flow Cell Door** (Läbivooluküveti luugi sulgemine).
Läbivooluküveti uks sulgub automaatselt, RFID ja andurid kontrollitakse ning ekraanil kuvatakse läbivooluküveti ID.

SBS-i ja klastrikassettide laadimine

1. Avage vedelikusektsiooni luugid ja seejärel avage reagendi jahuti luuk.
2. Eemaldage selle olemasolul eelmise käituse kasutatud SBS ja klastrikassetid.
Kasutatud kassetidel on läbitorgatud fooliumtihendid.
3. Kõrvaldage kasutamata sisu kasutusest vastavalt rakenduvatele standardi.
Klastrikasseti positsiooni nr 30 ohutuks kasutusest kõrvaldamiseks vt jaotist [Asendi #30 eraldamine leheküljel 20](#).
4. Laadige ettevalmistatud kassetid reagendi jahuti sahtlisse järgmiselt, nii et sildid oleksid seadme tagaosa poole.
 - Asetage SBS-kassett (hall silt) vasakusse asendisse.
 - Asetage korgita teegikatsutiga kassett (oranž etikett) õigesse asendisse.

joonis 9 Reagendikasseti laadimine

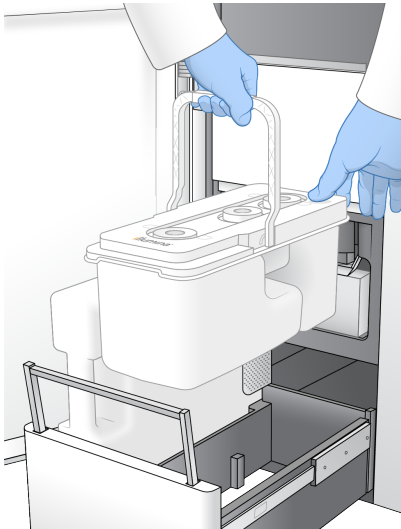


5. Lükake sahtel jahutisse ja sulgege seejärel reagendi jahuti luuk.
Andureid ja RFID-e kontrollitakse. Teegikatsuti ID-d ja kaks kassetti ilmuvad ekraanile.

Puhverkasseti laadimine

1. Puhvrisahtli avamiseks tõmmake metallkäepidet.
2. Eemaldage kasutatud puhvrikassett puhvrisahtli paremalt küljelt.
Kasutatud puhverkassetil on augustatud fooliumtihendid.
3. Asetage uus puhvrikassett puhvrisahtlisse nii, et Illumina silt oleks sahtli esikülje poole. Joondage kassett sahtli põrandal ja külgedel olevate tõstetud juhikutega.
Õigesti täitmisel on puhvrikassett ühtlaselt paigas ja sahtel saab sulguda.

joonis 10 Puhverkasseti laadimine



4. Kui mõlemad kasutatud reagentipudelid on tühjendatud, märkige märkeruut, mis kinnitab, et mõlemad kasutatud reagentipudelid on tühjad.

MÄRKUS. Kasutatud reagentipudelite tühjendamata jätmine võib põhjustada käituse katkemise ja ületäitumise, mis kahjustab seadet ja toob kaasa ohutusrisi.

5. Kui kulutarvikud on lisatud, valige jätkamiseks **Run Selection** (Käivita valik).

Vali ja alusta käitust

Seade skannib teegikatsuti ID ja otsib sobivat planeeritud käitust.

1. Kui iga kasutatava külje kohta leitakse teegikatsuti ID-le vastav planeeritud käitus, jäetakse käituse valik vahele. Jätkamiseks valige **Review** (Ülevaade).
2. Kui ühe või mõlema poole jaoks sobivat käitust pole, valige **Run Selection** (Käituse valimine) ja seejärel valige üks või mitu planeeritud käitust.
Mõlemal pool ei saa valida sama plaanilist käitust.
3. Kui valitud on üks või mitu käitust, valige **Pre-Run Checks** (Käivitamiseelsed kontrollid).
4. Oodake umbes 5 minutit, kuni käituseelne kontroll on lõppenud.
Käitus algab automaatselt pärast edukat lõpetamist.

MÄRKUS. Kõvaketta ületäitumise vältimiseks ärge kopeerige andmeid kausta C:\ pärast käituse käivitumist.

Käituseelse kontrolli tõrked

1. Kui käituseelsed kontrollid nurjuvad anduri vea tõttu, nt läbivooluküveti ei tuvastatud, peate töövoost väljuma ja selle taaskäivitama.
2. Muude käituseelsete kontrollide nurjumise korral valige **Retry** (Proovi uuesti), et taaskäivitada ebaõnnestunud kontroll, või **Retry All** (Proovi kõik uuesti), et kõik kontrollid taaskäivitada. Vead tuleb lahendada enne, kui käitus saab käivituda.
3. Vea üksikasjade nägemiseks valige ikoon **Error** (Viga).
4. Kui joenduskontroll nurjub, lahendage viga järgmiselt.
 - a. Valige **Reload** (Lae uuesti) ja seejärel **OK** (Korras), et naasta kuvale Load (Laadi).
 - b. Eemaldage seadme ülaosast kõik esemed ja valige seejärel **OK** (Korras). Avaneb läbivooluküveti luuk.
 - c. Laadige läbivooluküvett uuesti ja valige seejärel **Run Setup** (Käituse seadistus).
 - d. Jätkake iga kuvaga, et iga RFID uuesti lugeda ja naasta kuvale Pre-Run Checks (Käituseelsed kontrollid).
 - e. Tehke kontroll uuesti.

Käituse edenemise jälgimine






Järgnevad üksikasjad kuvatakse käituse töösoleku ajal aknas Sequencing (Sekvenerimine). Sekvenerimise kuvale pääseb ligi peamenüü kaudu.

- **Status of individual run steps (Individaalsete käitusetappide olek)**
- **Time to completion** (Lõpuni jäänud aeg) – käituse lõpetamise kuupäev ja kellaaeg (aaaa-kk-pp hh:mm).
- **Run progress** (Käituse edenemine) – käimasolev käitusetapp. Edenemisriba ei ole iga etapi käituse olekuga proportsionaalne.
- **Q-scores** (Q-skoorid) – näitab kvaliteediskooride (Q-skoorid) jaotust.
- **Intensity** (Intensiivsus) – näitab klastrite intensiivsuse väärtust iga paani 90. protsentiilina. Diagrammi värvid tähistavad punaseid ja rohelisti kanaleid.
- **Clusters passing filter (%)** (Filtrit läbivad klastrid (%)) – näitab filtrit läbivate klastrite protsenti.
- **Projected Total Yield (GB)** (Prognoositud kogutoodang (GB)) – läbivooluküveti käituse eeldatav tootlus. Kui rajapõhised mõõdikud on valitud (H), on kuvatavad numbrid jooksev saagis raja kohta ja need värskendatakse tsükli kohta kogu käituse vältel.
- **Q30** – aluste nimetamised käituse vältel, mille Q-skoor on ≥ 30 .

Olekuikoonid

Oleku ikoon NVOS liidesel näitab käituse olekut. Icoonil olev number näitab oleku tingimuste arvu.

Käituse oleku muutumisel ikoon vilgub. Valige ikoon tingimuse kirjelduse vaatamiseks. Teate aktseptsiooniks valige suvand **Acknowledge** (Kinnita) ja dialoogiakna sulgemiseks valige käsk **Close** (Sulge).

Olekuikoon	Oleku nimi	Kirjeldus
	Olek on korras	Süsteem on tavaolekus.
	Töötleb	Süsteem töötleb.
	Hoiatus	Tekkis hoiatus ja vajalik on tähelepanu. Hoiatused ei peata käitust ega nõua enne jätkamist toimingute tegemist.
	Tõrge	Esines tõrge. Tõrked nõuavad enne käituse jätkamist toimingut.
	Teave	Saadaval on mittekriitiline teade.

Käituse mõõdikud

Tarkvara kuvab käituse ajal genereeritud mõõdikud. Mõõdikud esitatakse diagrammide, graafikute ja tabelitena rakenduse RTA3 genereeritud andmete põhjal ning need salvestatakse InterOp-failidesse.

Klasterdamine võtab umbes 2 tundi, seejärel algab sekveneerimine 1. tsükliga. Mõõdikuid värskendatakse käituse edenedes. Filtrit, saagist ja kvaliteediskoore läbivad klastrid on saadaval pärast 26. tsüklit. Enne 26. tsüklit ei ole ükski väärtus saadaval ja need ei ole kohaldatavad.

Pärast sekveneerimist

Järgmistes jaotistes on toodud juhised sammude kohta, mis toimuvad pärast sekveneerimise lõpuleviimist.

Automaatne käitusjärgne pesemine

Kui sekveneerimine on lõppenud, käivitab tarkvara automaatse käitusjärgse pesu, mis kestab umbes 80 minutit. Süsteem pumpab 0,24% naatriumhüpokloriiti (NaOCl) positsioonist nr 17 ja lahjendab selle 0,12%-ni. 0,12% NaOCl pumbatakse ExAmp reagenti ja teegi positsioonidesse läbi läbivooluküveti ja seejärel kasutatud reagendipudelitesse. Pesemine loputab templiidi süsteemist välja, et vältida ristsaastumist.

Kui pesemine on lõppenud, viiakse süsteem ohutusse olekusse ja nupp Home (Kodu) muutub aktiivseks. Jätke kulutarvikud järgmise käitustsükli paigale. Pärast pesemist jäävad pipetiotsakud SBS-i ja klastrikassetidesse, et ennetada õhu süsteemi sisenemist. Puhvrikassetis olevad pipetiotsakud tõstetakse üles, nii et kasutatud reagendipudeleid saab tühjendada. Seejärel pumbatakse läbi kõikide liinide pesupuhver, et eemaldada süsteemist NaOCl ja reagendid.

MÄRKUS. Kui automaatse käitusjärgse pesemise ajal tekib viga ja käitusjärgne pesemine ei ole täielik, on vajalik hoolduspesu.

Asendi #30 eraldamine

Klastrikasseti positsioonis nr 30 olev mahuti sisaldab formamiidi. See eemaldatakse kasutatud klastrikassetist ja utiliseeritakse eraldi.



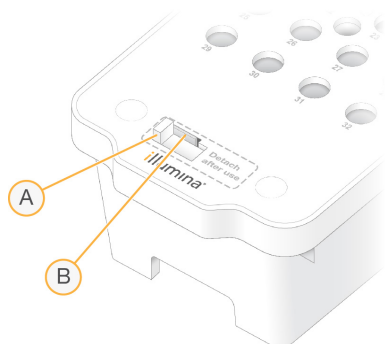
ETTEVAATUST!

See reagentide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käsitsege kasutatud reagente keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Täiendavat keskkonna-, tervise- ja ohutusteavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

1. Kandke kindaid ja lükake valge plastnupp kirjaga **Detach after use** (Eralda pärast kasutamist) paremale.
2. Asetage mahuti alla käsi või kõva pind ja vajutage läbipaistva t plastnuppu Illumina sildi poole, et mahuti klastrikasseti alt vabastada.

MÄRKUS. Hoiduge hoiundamisel klastrikassetide virnastamisest. Virnastamine võib põhjustada mahuti juhuslikku lahtitulekut.

joonis 11 Eemaldatav asend nr 30



- A. Valge plastnupp eraldamiseks
- B. Läbipaistev plastnupp vabastamiseks

3. Kõrvaldage mahuti kasutusest rakenduvate standardite kohaselt.

Sekveneerimisväljund

Sekveneerimise ajal edastatakse andmed automaatselt seadmest NovaSeq 6000Dx seade asukohta Illumina DRAGEN Server. Kui esmane analüüs lõpeb ja andmete ülekanne on lõpetatud, saab seadme Illumina DRAGEN Server sekundaarne analüüs automaatselt alata, kasutades analüüsisuvandeid, mis on määratletud rakenduses Illumina käivitushaldur valitud rakendusega. Saadud tulemused sõltuvad käituse seadistamisel valitud valikutest. Käituse tulemuste vaatamiseks valige soovitud käituse nimi käituste kuva vahekaardilt Completed (Lõpetatud). Väljundfailid leiate ka kuval Instrument Settings (Seadme sätted) määratud asukohast.

Reaalajas analüüs

NovaSeq 6000Dx seade käitab rakendust RTA3, Reaalajas analüüs tarkvara juurutust seadme arvutusmootoril (CE). RTA3 eraldab intensiivsusi kaamerast saadud kujutistest, teostab aluste nimetamist, määrab aluste nimetamisele kvaliteediskoori, ühtib PhiX-iga ja esitab andmed InterOp-failides.

Töötlusaja optimeerimiseks hoiustab RTA3 teavet mälus. Kui RTA3 lülitatakse välja, siis töötlus ei jätku ja kõik mälus töödeldavad käituse andmed lähevad kaduma.

RTA3 Sisendid

RTA3 nõuab töötlemiseks kohalikus süsteemimälus sisalduvaid paani kujutisi. RTA3 võtab vastu käituse teabe ja käsud seadmelt NVOS.

RTA3 Väljundid

Iga värvikanali kujutised edastatakse mälus seadmele RTA3 paanidena. Nende kujutiste põhjal väljastab RTA3 kvaliteediskooriga aluste nimetamise failide ja filtrifailide komplekti. Kõik teised väljundid toetavad väljundfaile.

Faili tüüp	Kirjeldus
Aluste nimetusfailid	Kõik paanid, mida analüüsitakse, lisatakse konkateneeritud aluste nimetamise faili (*.cbcl). Paanid samast reast ja pinnast kogutakse ühte CBCL faili iga rea ja pinna jaoks.
Filtrifailid	Iga paan koostab filtrifaili (*.filter), mis määratleb, kas klaster läbib filtrid.

RTA3 pakub reaalajas käituse kvaliteedimõõdikuid, mis on salvestatud InterOp-failidena, mis on paani, tsükli ja lugemitaseme mõõdikutega binaarne väljund.

Tõrgete lahendamine

RTA3 loob logifailid ja kirjutab need kausta Logs. Vead salvestatakse *.log-failivormingus tekstifailina.

Töötlemise lõpus edastatakse lõplikku väljundsihtkohta järgmised logifailid.

- `info_00000.log` võtab kokku tähtsad käituse sündmused.
- `error_00000.log` sisaldab käituse ajal ilmnenuid vigu.

- `warning_00000.log` sisaldab käituse ajal ilmnenud hoiatusi.

Läbivooluküveti paanid

Paanid on väikesed kujutise alad läbivooluküvetil. Kaamera teeb igast vaalust ühe pildi, mille tarkvara jaotab RTA3 töötlemiseks paanideks. Paanide koguarv sõltub sellest, kui palju radu, vaalusid ja pindu läbivooluküvetis kujutatakse.

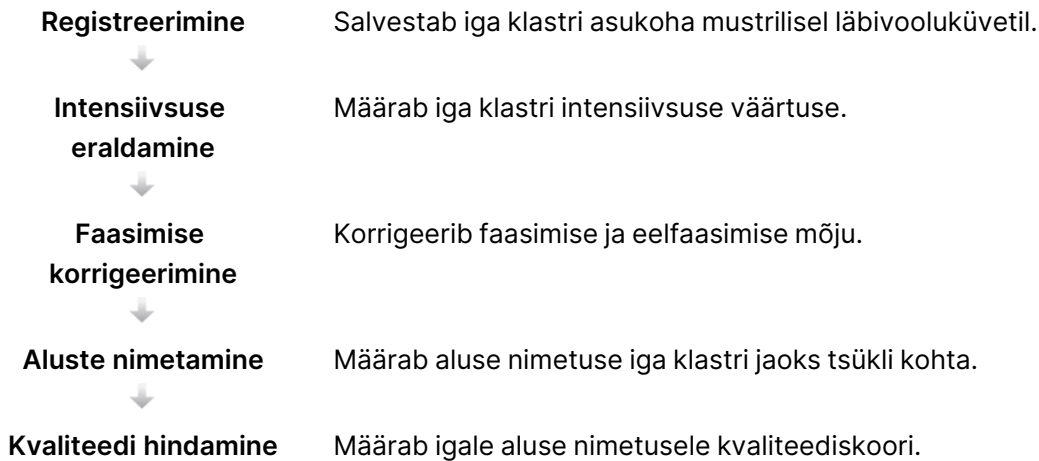
- S2 läbivooluküvetidel on kokku 1408 paani.
- S4 läbivooluküvetidel on kokku 3744 paani.

Läbivooluküveti komponendid	S2	S4	Kirjeldus
Rajad	2	4	Rada on sisend- ja väljundportidega füüsiline kanal.
Pinnad	2	2	S2 ja S4 läbivooluküvetid hõivatakse kahel pinnal: üleval ja all. Paani ülemine pind hõivatakse esimesena.
Vaalusid rajas	4	6	Vaal on läbivooluküveti raja veerg, mille kaamera hõivab ühe skannitud kujutisena.
Paane vaalu kohta	88	78	Paan on osa vaalust ja kujutab läbivooluküveti hõivatavat piirkonda.
Loodud paanide hulk kokku	1408	3744	Paanide koguarv võrdub rajad × pinnad × vaalud × paanid vaalu kohta.

Paani nimi on viiekohaline number, mis esindab paani asukohta läbivooluküvetil. Näiteks viitab paani nimi 1_1205 rajale 1, ülemisele pinnale, vaalule 2, paanile 5.

- Esimene number on raja number:
 - 1 või 2 S2 läbivooluküveti puhul.
 - 1, 2, 3 või 4 S4 läbivooluküveti puhul.
- Teine number näitab pinda: 1 ülemise jaoks ja 2 alumise jaoks.
- Kolmas number tähistab vaalu numbrit:
 - 1, 2, 3 või 4 S2 läbivooluküveti puhul.
 - 1, 2, 3, 4, 5 või 6 S4 läbivooluküveti puhul.
- Kaks viimast numbrit näitavad paani numbrit. Nummerdamine algab 01-ga läbivooluküveti väljundi otsa juures kuni 88-ni või 78-ni sisselaske otsas.
 - 01 kuni 88 S2 läbivooluküveti puhul.
 - 01 kuni 78 S4 läbivooluküveti puhul.

Reaalajas analüüsi töövoog



Registreerimine

Registreerimine joondab kujutise nanosüvendite pööratud ruutmassiiviga muustrilisel läbivooluküvetil. Nanosüvendite järjestatud paigutuse tõttu on iga klasteri X- ja Y-koordinaadid ettemääratud. Klasterite asendid on kirjutatud iga käituse klasteri asukoha (s.locs) faili.

Kui tsükli mõne pildi registreerimine nurjub, siis selle tsükli paani aluse nimetusi ei looda.

Intensiivsuse eraldamine

Pärast registreerimist arvutab intensiivsuse eraldamine iga nanosüvendi intensiivsuse väärtuse antud pildil. Kui registreerimine nurjus, ei ole võimalik selle paani intensiivsust eraldada.

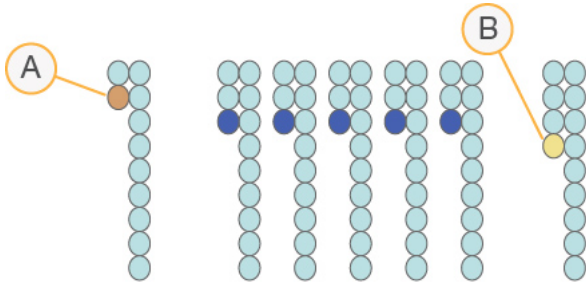
Faasimise korrigeerimine

Sekvenerimisreaktsiooni ajal pikeneb iga DNA ahel klasteris ühe aluse võrra tsükli kohta. Faasimine ja eelfaasimine toimub, kui ahel muutub praeguse kaasamistsükliga faasist väljas olevaks.

Faasimine toimub, kui aluse moodustamine jääb maha.

Eelfaasimine toimub, kui aluse moodustamine hüppab ette.

joonis 12 Faasimine ja eelfaasimine



- A. Lugem alusega, mis on faasimises
- B. Lugem alusega, mis on eelfaasimises

RTA3 korrigeerib faasimise ja eelfaasimise mõju, mis maksimeerib andmete kvaliteeti igas tsüklis kogu käituse vältel.

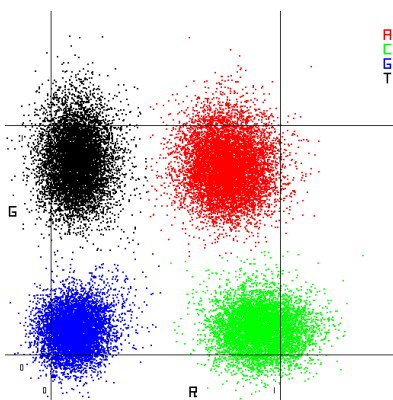
Aluste nimetamine

Aluste nimetamine määrab aluse (A, C, G või T) antud paani iga klastriga jaoks kindlas tsüklis. Seade NovaSeq 6000Dx seade kasutab kahekanalist sekveneerimist, mis nõuab nelja DNA-aluse andmete kodeerimiseks ainult kahte kujutist, üks rohelisest ja teine punasest kanalist.

Nimetuse puudumine tuvastatakse kui N. Nimetuse puudumised leiavad aset, kui klaster ei läbi filtrit, registreerimine nurjub või klaster nihkub kujutiselt välja.

Iga klastrite intensiivsused eraldatakse punaselt ja roheliselt kujutiselt ning võrreldakse omavahel, mille tulemuseks on neli erinevat populatsiooni. Iga populatsioon vastab alusele. Aluste nimetamise protsess määrab, millisesse klastrisse iga populatsioon kuulub.

joonis 13 Klastrite intensiivsuse visualiseerimine



tabel 8 Aluste nimetused kahekanalilises sekveneermises

Alus	Punane kanal	Roheline kanal	Tulemus
A	1 (sees)	1 (sees)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust nii punases kui ka rohelises kanalil.
C	1 (sees)	0 (väljas)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust ainult punases kanalil.
G	0 (väljas)	0 (väljas)	Klastrid, mis näitavad intensiivsuse puudumist teadolevas klastril asukohas.
T	0 (väljas)	1 (sees)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust ainult rohelises kanalil.

Klastrite läbipääsufilter

Käituse ajal filtreerib RTA3 toorandmeid, et eemaldada lugemid, mis ei vasta andmete kvaliteedikünnisele. Kattuvad ja madala kvaliteediga klastrid eemaldatakse.

Kahekanaliliste analüüside jaoks kasutab RTA3 aluse nimetuse puhtuse määramiseks (intensiivsuse puhtuse mõõtmiseks) populatsioonipõhist süsteemi. Klastrid läbivad filtri (PF), kui 25 esimeses tsükklis pole rohkem kui ühel aluse nimetusel puhtusetase alla fikseeritud künnise. Kui see on hõlmatud, toimub PhiX-i joondamine 26. tsükli ajal filtri läbinud klastrite paanide alamkogumil. Klastrid, mis filtrit ei läbi, ei ole aluse nimetusega ja neid ei joondata.

Kvaliteediskoorid

Kvaliteediskoor (Q-skoor) on ebaõige aluse nimetamise tõenäosuse prognoos. Kõrgem Q-skoor näitab, et aluse nimetus on kõrgema kvaliteediga ja tõenäolisemalt õige. Kui Q-skoor on määratud, salvestatakse tulemused aluste nimetamise (*.cbcl) failidesse.

Q-skoor on kompaktne viis väikeste vea tõenäosuste edastamiseks. Kvaliteediskoor on esitatud kujul Q(X), kus X on skoor. Järgmises tabelis on toodud kvaliteediskoori ja vea tõenäosuse seos.

Q-skoor Q (X)	Tõrke tõenäosus
Q40	0,0001 (1/10 000)
Q30	0,001 (1/1000)
Q20	0,01 (1/100)
Q10	0,1 (1/10)

Kvaliteedi hindamine ja raporteerimine

Kvaliteedi hindamine arvutab iga aluse nimetamise jaoks ennustuste komplekti ja seejärel kasutab ennustatud väärtusi kvaliteeditabelist Q-skoori otsimiseks. Kvaliteeditabelid on loodud sekveneermisplatvormi ja keemiaaversiooni kindla konfiguratsiooniga loodud käituste puhul optimaalselt täpsete kvaliteediprognoside pakkumiseks.

Kvaliteedi hindamine põhineb Phredi algoritmi modifitseeritud versioonil.

Q-tabeli genereerimiseks seadmes NovaSeq 6000Dx seade määrati kolm gruppi aluse nimetusi, mis põhinevad nende spetsiifiliste ennustavate funktsioonide klastritel. Pärast aluse nimetuste rühmitamist arvutati empiiriliselt keskmine vigade määr iga kolme grupi jaoks ja vastavad Q-skoorid salvestati Q-tabelisse koos ennustavate funktsioonidega korreleeruvalt selle grupiga. Sellisena on RTA3-ga võimalikud ainult kolm Q-skoori ja need Q-skoorid esindavad selle grupi keskmist vigade määra. Üldiselt on selle tulemuseks lihtsustatud, kuid väga täpne kvaliteedi hindamine. Kolm kvaliteeditabelis toodud gruppi vastavad marginaalsele (< Q15), keskmisele (u Q20) ja kõrge kvaliteediga (> Q30) aluste nimetustele ning neile on määratud spetsiifilised skoorid, mis on vastavalt 12, 26 ja 34. Lisaks sellele määratakse puuduva nimetuse korral null-skoor 2. See Q-skoori aruandluse mudel vähendab salvestusruumi ja ribalaiuse nõudeid ilma täpsust või jõudlust mõjutamata.

joonis 14 Lihtsustatud Q-skoori määramine RTA3-ga



Sekvenerimise väljundfailid

Faili tüüp	Faili kirjeldus, asukoht ja nimi
Aluste nimetusfailid	Iga analüüsitud klaster sisaldub aluste nimetusfailis, mis on koondatud ühte faili iga tsükli, raja ja pinna kohta. Koondfail sisaldab aluse nimetust ja kodeeritud kvaliteediskoori iga klasteri kohta. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, näiteks L001_1.cbcl
Klastrite asukohafailid	Iga läbivooluküveti kohta sisaldab binaarne klasteri asukohafail XY-koordinaate paanis olevate klastrite kohta. Kuusnurkne paigutus, mis ühtib läbivooluküveti nanosüvendite paigutusega, eelmääratleb koordinaadid. Data\Intensities s_[lane].locs

Faili tüüp	Faili kirjeldus, asukoht ja nimi
Filtrifailid	Filtrifail määratleb, kas klaster läbis filtrid. Filtrifailid luuakse 26. tsükli 25 tsükli andmete põhjal. Iga paani jaoks luuakse üks filtrifail. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Käituse teabefail	Sisaldab käituse nime, tsüklite arvu igas lugemis, kas lugem on indekseeritud lugem, ning läbivooluküveti vaalude ja paanide arvu. Käituse teabefail luuakse käituse alguses. [Root folder],RunInfo.xml
Pisipiltide failid	Pisipildid iga sekveneerimise lugemi esimese tsükli kohta. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] – failid salvestatakse iga tsükli alamkataloogis. s_[lane][tile]_[channel].jpg – pisipildi kujutis sisaldab paani numbrit.

Sekveneerimise väljundkausta struktuur


NVOS loob väljundkausta nime automaatselt.


 **Config** (Konfigureeri) – käituse konfigureerimise sätted.

 **Logs** (Logid) – logifailid, mis kirjeldavad tööetappe, seadme analüüsi ja RTA3 sündmusi.

 SampleSheet.csv – vajadusel proovileht või muu lisatud fail.


 **Data** (Andmed)

 **Intensities (intensiivsused)**


 **BaseCalls (põhinimetused)**


 **L00[X]** – aluse nimetuse failid (*.cbcl), koondatud ühte faili raja, pinna ja tsükli kohta.

 s.locs – käituse klasteri asukohtade fail.

 **InterOp** – kahendfailid.

 **Recipe** (Retsept) – käitusespetsiifiline retseptifail.

 **Thumbnail Images** (Pisipildid) – pisipildid iga 10. paani kohta.

 **LIMS** – vajadusel käituse seadistusfail (*.json).

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

☰ SequenceComplete.txt

☰ IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

☰ Manifest.tsv

Hoiatused ja ettevaatusabinõud



ETTEVAATUST!

USA föderaalseaduse kohaselt võib seda seadet müüa või kasutada ainult arst (või arsti korraldusel) või muu meditsiinitöötaja, kellele on oma tegevuskoha osariigi seaduse järgi väljastatud kutsetunnistus (või tema korraldusel).

- **Mõni seadmega NovaSeq 6000Dx seade kasutatav Illumina pakutav reagenti komponent sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikiltit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käsitsege kasutatud reagente keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel.** Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalast lisateavet vaadake ohutuskaardilt (Safety Data Sheets, SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.
- Esitatud juhiste eiramine võib viia valetulemusteni või märkimisväärselt vähendada proovide kvaliteeti.
- Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökeskkonnas. Proovide ja komplekti reagentide käsitlemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikiltleid. Pärast proovide ja komplekti reagentide käsitlemist peske käed põhjalikult puhtaks.
- Korralikud laboritavad ja hea laborisisene hügieen on vajalikud, et vältida reagentide, seadmete ja genoomsete DNA-proovide saastumist PCR-i produktiga. PCR-i produktiga saastumine võib põhjustada ebatäpseid ja ebausaldusväärseid tulemusi.
- Saastumise vältimiseks tagage, et amplifitseerimiseelsetes ja -järgsetes piirkondades oleks olemas vajalik varustus ja vajalikud kulutarvikud (nt pipetid, pipeti otsakud, kütteplokid, segistid ja tsentrifuugid).
- Proovide paarimise indeks peab vastama täpselt trükitud plaadi kujundusele. Rakendus DNA Prep with Enrichment täidab automaatselt proovinimedega seotud indeksi praimerid, kui need sisestatakse käituse seadistamisel. Kasutajal soovitatakse kinnitada prooviga seotud indeksi praimerid enne sekveneerimiskäituse alustamist. Proovi ja plaadi kujunduse mittevastavus põhjustab positiivse proovi puudulikku identifitseerimist ja tulemuste valesti esitamist.
- Paigaldamine arvuti kaitsmiseks viiruste eest on tungivalt soovitatav kasutada viirustõrjetarkvara, mille hangib kasutaja.
- Ärge kasutage seadet NovaSeq 6000Dx, kui üks paneelidest on eemaldatud. Seadme kasutamine eemaldatud paneelidega põhjustab kokkupuuteohu liinipinge ja alalisvoolupingega.
- Ärge puudutage läbivooluküveti kambri läbivooluküveti alust. Selle kambri kütteseadet töötab temperatuuril vahemikus 22 °C kuni 95 °C ja võib põhjustada põletusi.

- Seade kaalub umbes 480 kg (1059 naela) ja mahapillamisel või valekasutuse korral võib see tekitada raskeid vigastusi.

Toimivusnäitajad

Seadme NovaSeq 6000Dx jõudlusnäitajad määrati, kasutades teegi ettevalmistamiseks rakendust Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx, rakendusi NovaSeq 6000Dx S2 reagendi v1.5 komplekt (300 tsükli) ja NovaSeq 6000Dx S4 reagendi v1.5 komplekt (300 tsükli) sekveneerimiseks ning rakendust DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iduliini ja somaatiliste variantide tuvastamiseks sekundaarseks analüüsiks. Uuringud sisaldasid proovi indekseerimist, proovi ülekandumist, DNA sisendit, analüütilist tundlikkust (kriitiline väärtus / avastamispääs), täpsust, kordustäpsust, meetodi võrdlust ja korratavust. Eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajaid, nagu eraldamise meetod või segavad ained, vaadake allikast *Komplekti Illumina DNA Prep With Enrichment Dx pakendi infoleht*.

Toimivusnäitajatel kasutatud arvutuste definitsioonid

1. Positiivse protsendi ühtivus (Positive Percent Agreement, PPA) arvutatakse referentsmeetodiga variantidena klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
 - $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate variandi lookuste arv}) / (\text{variandi lookuste koguarv})$
Analüüsi esitatavad variandi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt positiivsed (TP-d). Referentsnimetuste või erineva variandi nimetusena analüüsi poolt esitatavad variandi lookused on valenegatiivsed (VN-id).
2. Negatiivse protsendi ühtivus (Negative Percent Agreement, NPA) arvutatakse referentsmeetodiga metsiktüübiks klassifitseeritavate lookuste osakaaluna, mida analüüs õigesti esitab.
 - $(\text{Analüüsi õigesti esitatavate metsiktüüpi lookuste arv}) / (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv})$
Analüüsi esitatavad metsiktüüpi lookused, mis on kooskõlas referentsmeetodiga, on tõeselt negatiivsed (TN-id). Analüüsi poolt variantidena esitatavad metsiktüüpi lookused on valepositiivsed (VP-d).
3. Üldine protsendi ühtivus (Overall Percent Agreement, OPA) arvutatakse lookuste osakaaluna, mida analüüs referentsmeetodi suhtes õigesti esitab.
 - $((\text{Analüüsi poolt õigesti esitatud variandi lookuste arv}) + (\text{analüüsi poolt õigesti esitatud metsiktüüpi lookuste arv})) / ((\text{variandi lookuste koguarv}) + (\text{metsiktüüpi lookuste koguarv}))$
4. PPA, NPA ja OPA arvutused ei sisalda nimetusi (variant või referentslookus ei vasta ühele või mitmele kvaliteedifiltrile).
5. Positiivsete nimetamiste protsent (Percent Positive Calls, PPC) on tuvastatud variandiga vaatluste arv jagatuna testitud vaatluste koguarvuga, välja arvatud kehtetud vaatlused või madala sügavusega filtreeritud vaatlused.
6. Negatiivsete nimetamiste protsent (Percent Negative Calls, PNC) arvutatakse positsioonis oleva tulemusena tehtud vaatluste arvuna, välja arvatud kehtetud vaatlused ja madala sügavusega filtreeritud vaatlused.

- Autosoomi nimetatavuse protsent (Percent Autosome Callability) arvutatakse mitte-N võrdlusasendite protsendina sihtpiirkondades autosoomsetes kromosoomides, mille genotüüp on läbiv.

Proovi indekseerimine

Teegi ettevalmistamise ajal lisatavad proovi indeksi praimerid määravad igale proovi DNA-le kordumatu järjestuse. Need kordumatud järjestused võimaldavad koondada ühte sekveneerimiskäitusesse mitu proovi. Proovi indekseerimist kasutatakse nii idutee kui ka somaatilise töövoos jaoks. Selle uuringu eesmärk oli tuvastada minimaalne (12) ja maksimaalne (192) proovide arv, mida saab töödelda seadmega NovaSeq 6000Dx seade ühes sekveneerimiskäituses. Kahteteist unikaalset Platinum Genome'i DNA proovi (NA12877–NA12888) analüüsiti vähemalt 12 eri indeksi praimer kombinatsiooniga proovi kohta. Proovitegid valmistati, kasutades representatiivset analüüsi, mis on loodud analüüsima mitmesuguseid geene, mis katavad 1 970 505 alust kõigis 23 inimese kromosoomis. Neljast Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoos sekveneerimistsüklist rakendusega DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx saadud proovitulemusi võrreldi Platinum Genomes versiooniga 2016–1,0.

Esimeste käituste puhul sekveneeriti 192 unikaalselt indekseeritud proovitehast kahes järjestustsükli, millest igaüks sisaldas S2 ja S4 reagente, et kontrollida nii maksimaalset toetatud indeksite arvu kui ka analüüsi võimekust teha püsivalt genotüübi määramise määrangut antud proovi puhul erinevate indekseerimispraimer kombinatsioonide vahel. Käituste teises komplektis sekveneeriti kaksteist unikaalset indekseeritud prooviteeki kahes sekveneerimiskäituses, millest ühes kasutati S2 reagenti ja teises S4 reagenti, et kontrollida toetatud indeksite miinimumarvu.

192 indeksiga käitustes oli SNV-de PPA vahemik 99,7% kuni 100%, insertioonide PPA oli 100%, deletsioonide PPA oli vahemikus 96,7% kuni 100% ning NPA oli 100%. 12-indeksiga käituste puhul oli SNV-de PPA vahemik 99,7% kuni 100%, insertioonide PPA vahemikus 89,6% kuni 100%, deletsioonide PPA vahemikus 94,6% kuni 100% ja NPA oli 100%.

Proovi ülekandumine

Seadmega NovaSeq 6000Dx seade saab sekveneerida mitut proovi ja kontrollmaterjale ühes sekveneerimiskäituses. Uuring viidi läbi proovi ülekande ulatuse hindamiseks ühes sekveneerimiskäituses (käitusesisene) ja sekveneerimiskäituste vahel (käitustevaheline). Mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsi abil, mis katab 1 970 505 bp 23 eri kromosoomis (sh mõlemad sugukromosoomid), analüüsiti kaksteist Platinum Genome'i DNA proovi (kuus mehe ja kuus naise proovi). Teegid sekveneeriti Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise analüüsi töövoogu kasutades seadmel NovaSeq 6000Dx seade, kasutades rakendust DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Meessoost proovide ülekandumist naissoost proovidele täheldati Y-kromosoomi ampliconi lugemite olemasolu tõttu naissoost proovides.

Käitusesisene ülekandumine võib tekkida klastriloomisel, indeksi tsükli aluse nimetamisel ja proovi demultipleksimisel. Sekveneerimistsükli proovi ülekandumise testimisel sekveneeriti seadmel NovaSeq 6000Dx seade teegi valim, mis koosneb vähemalt kaheteistkümnest replikaadist igast unikaalsest mees- ja naissoost proovist pluss kahest mallita kontrollproovist, mis moodustasid kokku 192 unikaalselt indekseeritud teeki, mis koosnes kahest sekveneerimistsüklist, millest üks sisaldas S2 ja teine S4 reagente. Käitusesisest

proovi ülekandumise hindamiseks võrreldi iga naissoost replikaadi Y-kromosoomi amplikoni katvust kõigi kogumis olevate meessoost replikaatide Y-kromosoomi amplikoni katvusega. Käitusaegse ülekande 95. protsentiil oli S2 ja S4 reagentide puhul vastavalt 0,0090% ja 0,041%.

Käitustevahelise prooviülekande testimiseks valmistati ette kaks teegikogumit ja sekveneeriti järjestikku ühel seamel NovaSeq 6000Dx seade, kus küljel A kasutati S4 reagente ja küljel B S2 reagente. Esimene kogum sisaldas kuue unikaalse naissoost proovi vähemalt kahteteist replikaati ning lisaks kaht mallita kontrollproovi, moodustades kokku 96 unikaalselt indekseeritud teeki. Teine kogum sisaldas kuue unikaalse meessoost proovi vähemalt kahteteist replikaati ning lisaks kaht mallita kontrollproovi, kokku 96 unikaalselt indekseeritud teeki. Mõlema kogumiga kasutati sama indeksadapterite komplekti. Emaskogumit sekveneeriti esimesena, millele järgnes isaskogumi sekveneerimiskäitus, millele omakorda järgnes emaskogumi sekveneerimiskäituse kordus. Käitustevahelist proovi ülekandumist analüüsiti vastavalt reagenti S2 ja S4 tüübile ning selleks võrreldi Y-kromosoomi amplikoni katvust emaskogumi korduskäituse ja isaskogumi käituse vastavate replikaatide vahel. Käitustevahelise prooviülekande 95. protsentiil oli S2 ja S4 reagentide puhul vastavalt 0,0089% ja 0,012%.

DNA sisend

Veri (Germline)

Tuvastati vere DNA sisendvahemik komplekti Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx tarbeks, kasutades rakendust DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx seadmele NovaSeq 6000Dx. Seda vahemikku hinnati järjestikuste lahjenduste katsega, kasutades kaheksat Platinum Genome DNA proovi (NA12877 – NA12884), mida analüüsiti mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsiga, mis katab 1 970 505 alust kõigis inimese 23 eri kromosoomis. Teegid järjestati ühel seadmeh NovaSeq 6000Dx seade kasutades ühte NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid ja ühte NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid.

Seitset proovi analüüsiti duplikaatidena kuuel DNA sisendi tasemel vahemikus 1000 ng kuni 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ja 10 ng). Kaheksandat proovi (NA12884) testiti ühe replikaadina 10 ng sisendi juures ja duplikaadina kõigil teistel sisendtasemetel. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi genotüüpe Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0. Tulemused määrati iga sisendtaseme kohta. Iga varianttüüpi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) PPA tulemused esitatakse jaotises [Iga vere DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi leheküljel 32](#). NPA esitatakse jaotises [NPA iga vere DNA sisendi kohta leheküljel 32](#). Kõigi sisendtasemete täpsus oli sarnane. Komplekti Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx soovituslik vere DNA sisend on 50–1000 ng, vastavalt ülem- ja alampiiriga 1000 ng ja 10 ng, et olla vastavuses toimivusnäitajatega sekveneerimisel seadmega NovaSeq 6000Dx.

tabel 9 Iga vere DNA sisendi PPA tulemused variandi tüübi järgi

DNA sisend (ng)	Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	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	Insertsioon	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	Deletsioon	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50			2207	3	30	99,9
100			2199	1	40	>99,9
250			2201	0	39	100
1000			2195	2	43	99,9

tabel 10 NPA iga vere DNA sisendi kohta

DNA sisend (ng)	TN	VP	Nimetuseta referents	NPA (%)
10	115449045	384	285751	>99,9
25	123012157	415	438153	>99,9
50	122985299	369	465043	>99,9
100	122976660	321	473730	>99,9
250	122971099	331	479289	>99,9
1000	122978527	324	471882	>99,9

FFPE (moodul Somatic)

Komplekti formaliinis fikseeritud parafiini sisestatud (FFPE) DNA sisendvahemik komplektile Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutamisel määrati kindlaks NovaSeq 6000Dx jaoks. Seda vahemikku hinnati järjestikuste lahjenduste katsega, kasutades kahte Platinum Genome'i proovi, mida analüüsiti mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsiga, mis katab 1 970 505 alust inimese kõigis 23 kromosoomis. Teegid järjestati ühel seadmel NovaSeq 6000Dx seade kasutades ühte NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid ja ühte NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid.

Proovi GM12877 DNA-d lahjendati proovi GM12878 DNA-ga, et luua GM12877-13 unikaalsete GM12877 heterosügootsete ja homosügootsete variantidega sagedustel ligikaudu 6,5% ja 13%. Testiti ka lahjendamata GM12877. GM12877-13-d testiti duplikaatidena neljal DNA sisendi tasemel vahemikus 1000 ng kuni 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng ja 25 ng). GM12877-d testiti ühe replikaadina 250 ng-ga ja duplikaadina kõigil teistel sisendtasemetel. Täpsuse määramiseks võrreldi proovi variandi nimetamisi Platinum Genome'i versiooniga 2016-1,0. Tulemused määrati iga sisendtaseme kohta. Iga varianttüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) PPA esitatakse jaotises [Iga FFPE DNA sisendi PPA tulemused vastavalt varianttüübile ja siht VAF-ile leheküljel 33](#). NPA esitatakse jaotises [NPA iga FFPE DNA sisendi kohta leheküljel 34](#). Kõigi sisendtasemete täpsus oli sarnane. FFPE proovide puhul, mille väärtus ΔCq on ≤ 5 , on soovitatav DNA-sisend 50–1000 ng Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx komplekti puhul, mille ülemiseks ja alumiseks piirväärtuseks on 1000 ng ja 25 ng, mis tagab sooritusnäitajate vastavuse sekveneerimisel seadmes NovaSeq 6000Dx.

tabel 11 Iga FFPE DNA sisendi PPA tulemused vastavalt varianttüübile ja siht VAF-ile

DNA sisend (ng)	Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	Sihtlahjenduse VAF								
			0,065				0,13				
			TP	VN	Nimetuseta variant	PPA (%)	TP	VN	Nimetuseta variant	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	Insertsioon	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	Deletsioon	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

tabel 12 NPA iga FFPE DNA sisendi kohta

DNA sisend (ng)	Eeldatav metsiktüüp	TN	VP	Nimetuseta referents	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

Analüütiline tundlikkus (kriitiline väärtus [LoB] ja avastamispiir [LoD])

Käesolev uuring viidi läbi, et hinnata DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoo kriitilist väärtust (LoB) ja avastamispiiri (LoD) seadmel NovaSeq 6000Dx seade. Uuring viidi läbi mitmesuguste geenide uurimiseks mõeldud representatiivse analüüsiga, mis katab 1 970 505 alust kõigis inimese 23 eri kromosoomis. Platinum Genome'i rakuliinid GM12878 ja GM12877 fikseeriti formaliinis ja sisestati parafiini, seejärel eraldati DNA. GM12877 lahjendati GM12878-sse, valmistades proovid, mis koosnesid mahu järgi 0%, 4%, 6,5% ja 13% GM12877, nii et 489 unikaalse GM12877 variandi (454 SNV-d, 17 insertsiooni ja 18 deletsiooni) variantide esinemissagedus jäi vahemikku 0 kuni 0,13. Proovitegid valmistati Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx komplekti reagentide kahe partiiga ja need sekveneeriti kuuel järjestikusel päeval kahe seadmega NovaSeq 6000Dx seade ning ühe NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) ja ühe NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiiga, andes kokku kaksteist sekveneerimiskatset. See andis tulemuseks 288 vaatlust iga variandi kohta igas proovi lahjenduses. LoB ja LoD arvutati protokollis CLSI EP17-A2 esitatud klassikalise lähenemisega. LoB ja LoD arvutati S2 ja S4 reagentide puhul eraldi, ühendades sekveneerimistsükli kõigi variantide sagedused iga reagentitüübi puhul. I tüüpi viga määrati väärtusega 0,01 ja II tüüpi viga väärtusega 0,05.

LoB-d hinnati sõltumatult 489 lookuse suhtes kahe sekveneerimispartii ulatuses iga reagentitüübi (S2 või S4) ja teegi ettevalmistamise kohta. S2 reagentide puhul oli 95. protsentiili LoB 2,9%. S4 reagentide puhul oli 95. protsentiili LoB 2,2%.

LoD arvutati S2 puhul edukalt 478 variandis 489-st ja S4 puhul 485 variandis 489-st. Variandid, kus ühe või mõlema teegivalmistise jaoks ei määratud LoD-i väärtust, jäeti NovaSeq 6000Dx süsteemi jaoks lõplikult määratud LoD-st välja. Süsteemi NovaSeq 6000Dx LoD S2 ja S4 reagentidega määrati, võttes individuaalse variandi LoD-de 95. protsentiili. S2 reagentide puhul oli 95. protsentiili 478 variandi LoD-de puhul 4,8%. S4 reagentide puhul oli 95. protsentiil 485 variandi LOD-de puhul 3,9%.

Täpsus

Moodul Germline

Järgnev uuring viidi läbi, et hinnata rakenduse Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise analüüsi töövoos täpsust rakenduses DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx seadmel NovaSeq 6000Dx seade, kasutades NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekti (300 tsükli). Testiti nelja ainulaadset Platinum Genome DNA proovi, kasutades representatiivset analüüsi, mis oli ette nähtud erinevate geenide päringuks, hõlmates 1 970 505 alust (9232 sihtmärki) kõigis 23 inimese kromosoomis. Igat proovi testiti replikaatidega 12, välja arvatud NA12880, mida testiti replikaatidega 11. Kokku tehti kaheksateist käitust, kasutades kolme sekveneerimisseadet, kolme S2 reagentipartiid ja kolme operaatorit kuue päeva jooksul. Täpsus määrati SNV-de, insertioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0.

tabel 13 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Vaatlusi kokku ¹	Vaatluse tulemus ²	Tulemus käituse järgi ³
SNV PPA	846	99,8	99,9
Insertsioonide PPA	846	97,9	>99,9
Deletsioonide PPA	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ Arvutatud proovide arvuna käituse kohta (47) × käituste arv (18) = 846.

² Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõigis kaheksateistkümnes käituses.

³ Madalaim väärtus, kui iga käituse andmeid analüüsitakse kogumina.

Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta leheküljel 36 sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0 PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

tabel 14 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta

Proov	Autosoomi kutsutavus	Eeldatavad variandid ¹	TP	VN	Nimetuseta variant	TN	VP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ Variantide koguarv kõikides proovi replikaatides kõigis kaheksateistkümnes käituses.

[Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal leheküljel 36](#) sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferensmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

tabel 15 Mooduliga Germline saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal

Proov	SVN-d			Insertioonid			Deletsioonid		
	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

Proove analüüsiti väikeste insertioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas. Üldine kokkuvõte on esitatud kokkuvõttes [Mooduliga Germline tuvastatud indelite kokkuvõte leheküljel 36](#). Kokku oli 210 indelit suurusega vahemikus 1–18 bp (insertioonid) ja 1–21 bp (deletsioonid).

tabel 16 Mooduliga Germline tuvastatud indelite kokkuvõte

Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	PPA
Insertioon	36954	36953	1	0	>99,9
Deletsioon	29358	28986	16	356	99,9

Representatiivne analüüs koosnes 9232 sihtmärgist, mis katsid mitmesuguseid genoomilisi andmeid. Sihtmärkide GC sisaldus oli vahemikus 0,20–0,86. Sihtmärkidel oli ka mitmeid erinevaid üksiknukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed, mis on kogutud kromosoomi kohta, et määrata genoomi sisu mõju õigete protsentidele, on esitatud [Germline kromosoomide taseme täpsus leheküljel 37](#). Õigete nimetuste osakaal sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on alla 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvaid nimetusi.

tabel 17 Germline kromosoomide taseme täpsus

Kromosoom	Geenide arv	Sihtmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr1	47	728	138328	PolüA (12), PolüC (7), PolüT (14), PolüG (7), dinukleotiid (22), trinukleotiid (8), insertsioon (18), deletsioon (4)	[0,22 – 0,8]; Mediaan: 0,51	114888718	34	966860	>99,9	0,83

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr2	39	628	159588	PolüA (46), PolüC (8), PolüT (23), PolüG (7), dinukleotiid (22), trinukleotiid (8), insertsioon (5), deletsioon (2)	[0,24 – 0,81]; Mediaan: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35
chr3	38	650	137627	PolüA (18), PolüC (6), PolüT (18), PolüG (7), dinukleotiid (12), trinukleotiid (6), insertsioon (11), deletsioon (1)	[0,25 – 0,86]; Mediaan: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20

Kromosoom	Geenide arv	Sihmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr4	17	370	73766	PolüA (9), PolüC (7), PolüT (25), PolüG (6), dinukleotiid (5), trinukleotiid (5), insertsioon (2), deletsioon (2)	[0,27 – 0,77]; Mediaan: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	PolüA (10), PolüC (6), PolüT (12), PolüG (7), dinukleotiid (10), trinukleotiid (8), insertsioon (8), deletsioon (18)	[0,29 – 0,79]; Mediaan: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr6	39	453	126721	PolüA (28), PolüC (7), PolüT (33), PolüG (7), dinukleotiid (18), trinukleotiid (11), insertsioon (4), deletsioon (2)	[0,24 – 0,79]; Mediaan: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18
chr7	21	450	161501	PolüA (27), PolüC (8), PolüT (21), PolüG (7), dinukleotiid (31), trinukleotiid (5), insertsioon (1), deletsioon (4)	[0,2 - 0,77]; Mediaan: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr8	18	381	67775	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (13), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (9), insertsioon (4), deletsioon (1)	[0,26 – 0,78]; Mediaan: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30
chr9	23	347	87100	PolüA (12), PolüC (7), PolüT (27), PolüG (8), dinukleotiid (9), trinukleotiid (9), insertsioon (4), deletsioon (1)	[0,27 – 0,83]; Mediaan: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr10	14	317	66723	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (6), dinukleotiid (16), trinukleotiid (6), insertsioon (1), deletsioon (1)	[0,23 – 0,78]; Mediaan: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34
chr11	29	511	91786	PolüA (28), PolüC (8), PolüT (21), PolüG (7), dinukleotiid (26), trinukleotiid (7), insertsioon (2), deletsioon (2)	[0,28 – 0,8]; Mediaan: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr12	29	577	120365	PolüA (19), PolüC (8), PolüT (40), PolüG (7), dinukleotiid (7), trinukleotiid (7), insertsioon (1), deletsioon (5)	[0,26 – 0,77]; Mediaan: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54
chr13	13	283	58639	PolüA (24), PolüC (6), PolüT (12), PolüG (7), dinukleotiid (6), trinukleotiid (8), insertsioon (14), deletsioon (0)	[0,28 – 0,79]; Mediaan: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr14	11	147	26980	PolüA (21), PolüC (6), PolüT (18), PolüG (11), dinukleotiid (6), trinukleotiid (6), insertsioon (4), deletsioon (1)	[0,29 – 0,77]; Mediaan: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (13), PolüG (6), trinukleotiid (8), insertsioon (4), deletsioon (6)	[0,29 – 0,76]; Mediaan: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr16	21	366	80030	PolüA (7), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (10), insertsioon (15), deletsioon (21)	[0,3 - 0,76]; Mediaan: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15
chr17	36	645	118062	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (18), PolüG (8), dinukleotiid (13), trinukleotiid (6), insertsioon (18), deletsioon (16)	[0,28 - 0,82]; Mediaan: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihtmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr18	9	99	19195	PolüA (7), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (6), trinukleotiid (10), insertsioon (4), deletsioon (0)	[0,22 – 0,78]; Mediaan: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26
chr19	30	605	104004	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (31), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (7), insertsioon (2), deletsioon (21)	[0,33 – 0,83]; Mediaan: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr20	12	179	33795	PolüA (6), PolüC (6), PolüT (7), PolüG (8), trinukleotiid (9), insertsioon (5), deletsioon (0)	[0,31 – 0,84]; Mediaan: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	PolüA (28), PolüC (6), PolüT (24), PolüG (7), dinukleotiid (5), insertsioon (2), deletsioon (5)	[0,22 – 0,78]; Mediaan: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihimärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr22	10	187	36727	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (19), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (6), insertsioon (6), deletsioon (0)	[0,27 – 0,74]; Mediaan: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14
chrX	23	433	83576	PolüA (18), PolüC (8), PolüT (23), PolüG (9), dinukleotiid (5), trinukleotiid (23), insertsioon (3), deletsioon (0)	[0,2 - 0,72]; Mediaan: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13

Kromosoom	Geenide arv	Sihmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chrY	0	40	5476	PolüA (11), PolüC (8), PolüT (11), PolüG (5), insertsioon (0), deletsioon (0)	[0,4 - 0,59]; Mediaan: 0,45	0	0	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu

Proovi NA12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (National Institutes of Standards and Technology, NIST; v.2.19). 8009 sihtmärki 9232 sihtmärgist sisaldasid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 776 sihtmärgil oli osaline kattuvus ja 447 sihtmärgil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 1 831 483 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on näidatud proovi NA12878 [Proovi NA12878 Germline'i leping NIST andmebaasiga leheküljel 49](#).

tabel 18 Proovi NA12878 Germline'i leping NIST andmebaasiga

Proov	Käsitletud sihmärkide arv	Autosoomi kutsutavus	TP	VN	TN	VP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Selle kaheksateistkümneme mooduli Germline uuringu andmete põhjal saab seadmega NovaSeq 6000Dx seade järjekindlalt sekveneerida järgmist:

- GC sisaldus $\geq 20\%$ (kõik nimetatud alused 1692 sekveneeritud ampliconis GC sisaldusega 20% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0%)
- GC sisaldus $\leq 86\%$ (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud ampliconis GC sisaldusega 86% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0%)
- PolüA pikkused ≤ 46 (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud ampliconis, mis sisaldavad 46 PolüA kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,27%)

- Polüt pikkused ≤ 40 (13384074 alust 13384321 alusest 846-s sekveneeritud amplikonis, kus 40 Polüt kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 0,26%)
- PolüG pikkused ≤ 11 (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis 11 PolüG kordusega nimetati õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 0%)
- PolüC pikkused ≤ 8 (9815030 alust 9815035-st 5922-s sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 8 PolüC kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 0,53%)
- Dinukleotiidi korduse pikkused $\leq 31x$ (32233922 alust 32233926-st 846-s sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 31 dinukleotiidi kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 0,21%)
- Trinukleotiidi korduse pikkused $\leq 23x$ (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 23 trinukleotiidi kordust, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,21%)
- Insertiooni pikkused ≤ 18 (kõik nimetatud alused 1692 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 18 insertiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 7,71%)
- Deletsiooni pikkused ≤ 21 (kõik nimetatud alused 1692 sekveneeritud amplikonis, mis sisaldavad 21 deletsiooni, nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,14%)

Moodul Somatic

Siin kirjeldatud uuringut kasutati DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoos täpsuse hindamiseks seadmes NovaSeq 6000Dx seade komplekti NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) kasutamisel.

Uuringus kasutati representatiivset analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide uurimiseks 1 970 505 aluses (9232 amplikonis) kõigis inimese 23 kromosoomis. Platinum Genome'i DNA eraldati FFPE-ga töödeldud plokkidest, et luua kuus unikaalset proovi selles uuringus hindamiseks.

Proovi GM12877 DNA-d lahjendati proovi GM12878 DNA-ga, et luua GM12877-13 unikaalsete GM12877 heterosügootsete ja homosügootsete variantidega sagedustel ligikaudu 6,5% ja 13%. Proovi GM12878 DNA-d lahjendati sarnasel moel proovi GM12877 DNA-ga, et luua GM12878-13 unikaalsete GM12878 heterosügootsete ja homosügootsete variantidega sagedustel ligikaudu 6,5% ja 13%. Testiti ka lahjendamata GM12877 ja GM12878 DNA-d. Igat proovi testiti 12 replikaadiga, välja arvatud lahjendamata GM12878, mida testiti üheteistkümne replikaadiga. Kokku tehti kaheksateist käitust, kasutades kuue päeva jooksul kolme sekveneerimisseadet, kolme S4 reagentipartiid ja kahte operaatorit. Täpsus määrati SNV-de, insertioonide ja deletsioonide kohta, võrreldes tulemusi Platinum Genome'i versiooniga 2016-1.0.

tabel 19 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivuse kokkuvõte

Kriteeriumid	Tähelepanekute arv ¹	Tähelepanekute tulemus ²	Tulemus käituse järgi ³
Somaatiliste SNV-de PPA	846	99,8	98,9
Somaatiliste insertioonide PPA	846	100	100
Somaatiliste deletsioonide PPA	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ Arvutatud kui = proovide arv käituse kohta (47) × käituste arv (18) = 846.

² Madalaim vaadeldud väärtus proovi replikaadi kohta kõigis kaheksateistkümnes käituses.

³ Madalaim väärtus iga käituse andmete analüüsimisel kogumina.

Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta leheküljel 51 sisaldab proovi kohta positiivse ja negatiivse protsendi ühtivusega esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga PPA arvutuste jaoks. Kolm variandi tüüpi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) on kokku liidetud. Kuna referentsmeetod annab tulemusi ainult ühenukleotiidsete variantide ja insertioonide/deletsioonide kohta, võrreldakse mittevariantse aluse tulemusi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19 NPA arvutuste jaoks.

tabel 20 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta

Proov	Autosoomi kutsutavus	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	TN	VP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal leheküljel 52 sisaldab proovi kohta esitatud uuringuandmeid, kus variandi tulemusi võrreldakse hästi kirjeldatud liitreferentsmeetodiga. Tuvastust hinnatakse iga variandi tüübi (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid) kohta eraldi. Referentspositsioonid jäetakse välja.

tabel 21 Mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus proovi kohta variandi tüübi põhjal

Proov	SNV-d			Insertsioonid			Deletsioonid		
	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN	Eeldatav	TP	VN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

Nelja proovi analüüsi väikeste insertsioonide ja deletsioonide (indelite) nimetuste osas. Üldkokkuvõte on esitatud [Mooduliga Somatic tuvastatud indelite kokkuvõte leheküljel 52](#). Kokku oli 210 indelit suurusega vahemikus 1–18 bp (insertsioonid) ja 1–21 bp (deletsioonid).

tabel 22 Mooduliga Somatic tuvastatud indelite kokkuvõte

Variandi tüüp	Eeldatavad variandid	TP	VN	Nimetuseta variant	PPA
Insertsioon	11772	11772	0	0	100
Deletsioon	10098	9666	0	432	100

Representatiivne analüüs koosnes 9232 sihtmärgist, mis katsid mitmesuguseid genoomilisi andmeid. Amplikonide GC sisaldus oli vahemikus 0,20–0,86. Sihtmärkidel oli ka mitmeid erinevaid üksiknukleotiidi (nt PolüA, PolüT), dinukleotiidi ja trinukleotiidi kordusi. Andmed, mis on kogutud kromosoomi kohta, et määrata genoomi sisu mõju õigete nimetuste protsentidele, on esitatud jaotises [Mooduli Somatic kromosoomitaseme täpsus leheküljel 53](#). Õigete nimetuste osakaal sisaldab variandi ja referentsnimetusi ning selle väärtus on alla 100%, kui esineb valesid nimetusi või puuduvaid nimetusi.

tabel 23 Mooduli Somatic kromosoomitaseme täpsus

Kromosoom	Geenide arv	Sihtmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr1	47	728	138328	PolüA (12), PolüC (7), PolüT (14), PolüG (7), dinukleotiid (22), trinukleotiid (8), insertsioon (3), deletsioon (0)	[0,22 - 0,8]; Mediaan: 0,51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9
chr2	39	628	159588	PolüA (46), PolüC (8), PolüT (23), PolüG (7), dinukleotiid (22), trinukleotiid (8), insertsioon (5), deletsioon (1)	[0,24 - 0,81]; Mediaan: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr3	38	650	137627	PolüA (18), PolüC (6), PolüT (18), PolüG (7), dinukleotiid (12), trinukleotiid (6), insertsioon (1), deletsioon (1)	[0,25 - 0,86]; Mediaan: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3
chr4	17	370	73766	PolüA (9), PolüC (7), PolüT (25), PolüG (6), dinukleotiid (5), trinukleotiid (5), insertsioon (0), deletsioon (1)	[0,27 - 0,77]; Mediaan: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr5	25	507	90008	PolüA (10), PolüC (6), PolüT (12), PolüG (7), dinukleotiid (10), trinukleotiid (8), insertsioon (8), deletsioon (18)	[0,29 - 0,79]; Mediaan: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1
chr6	39	453	126721	PolüA (28), PolüC (7), PolüT (33), PolüG (7), dinukleotiid (18), trinukleotiid (11), insertsioon (0), deletsioon (1)	[0,24 - 0,79]; Mediaan: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr7	21	450	161501	PolüA (27), PolüC (8), PolüT (21), PolüG (7), dinukleotiid (31), trinukleotiid (5), insertsioon (1), deletsioon (4)	[0,2 - 0,77]; Mediaan: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4
chr8	18	381	67775	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (13), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (9), insertsioon (4), deletsioon (0)	[0,26 - 0,78]; Mediaan: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr9	23	347	87100	PolüA (12), PolüC (7), PolüT (27), PolüG (8), dinukleotiid (9), trinukleotiid (9), insertsioon (0), deletsioon (1)	[0,27 - 0,83]; Mediaan: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5
chr10	14	317	66723	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (6), dinukleotiid (16), trinukleotiid (6), insertsioon (0), deletsioon (0)	[0,23 - 0,78]; Mediaan: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr11	29	511	91786	PolüA (28), PolüC (8), PolüT (21), PolüG (7), dinukleotiid (26), trinukleotiid (7), insertsioon (2), deletsioon (2)	[0,28 - 0,8]; Mediaan: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8
chr12	29	577	120365	PolüA (19), PolüC (8), PolüT (40), PolüG (7), dinukleotiid (7), trinukleotiid (7), insertsioon (0), deletsioon (3)	[0,26 - 0,77]; Mediaan: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr13	13	283	58639	PolüA (24), PolüC (6), PolüT (12), PolüG (7), dinukleotiid (6), trinukleotiid (8), insertsioon (14), deletsioon (0)	[0,28 - 0,79]; Mediaan: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9
chr14	11	147	26980	PolüA (21), PolüC (6), PolüT (18), PolüG (11), dinukleotiid (6), trinukleotiid (6), insertsioon (4), deletsioon (0)	[0,29 - 0,77]; Mediaan: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr15	15	266	52091	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (13), PolüG (6), trinukleotiid (8), insertsioon (4), deletsioon (0)	[0,29 - 0,76]; Mediaan: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0
chr16	21	366	80030	PolüA (7), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (10), insertsioon (15), deletsioon (21)	[0,3 - 0,76]; Mediaan: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr17	36	645	118062	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (18), PolüG (8), dinukleotiid (13), trinukleotiid (6), insertsioon (18), deletsioon (1)	[0,28 - 0,82]; Mediaan: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	PolüA (7), PolüC (7), PolüT (15), PolüG (6), trinukleotiid (10), insertsioon (0), deletsioon (0)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr19	30	605	104004	PolüA (19), PolüC (7), PolüT (31), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (7), insertsioon (2), deletsioon (3)	[0,33 - 0,83]; Mediaan: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6
chr20	12	179	33795	PolüA (6), PolüC (6), PolüT (7), PolüG (8), trinukleotiid (9), insertsioon (5), deletsioon (0)	[0,31 - 0,84]; Mediaan: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6

Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi teabeleht

Kromosoom	Geenide arv	Sihthärgide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chr21	5	63	30642	PolüA (28), PolüC (6), PolüT (24), PolüG (7), dinukleotiid (5), insertsioon (1), deletsioon (0)	[0,22 - 0,78]; Mediaan: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
chr22	10	187	36727	PolüA (26), PolüC (7), PolüT (19), PolüG (7), dinukleotiid (5), trinukleotiid (6), insertsioon (6), deletsioon (0)	[0,27 - 0,74]; Mediaan: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6

Kromosoom	Geenide arv	Sihtmärkide arv	Aluste arv	Genoomiline sisu	GC vahemik	Õiged nimetused	Valed nimetused	Puuduvad nimetused	Õigete nimetuste %	Puuduvate nimetuste %
chrX	23	433	83576	PolüA (18), PolüC (8), PolüT (23), PolüG (9), dinukleotiid (5), trinukleotiid (23), insertsioon (3), deletsioon (0)	[0,2 - 0,72]; Mediaan: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7
chrY	0	40	5476	PolüA (11), PolüC (8), PolüT (11), PolüG (5), insertsioon (0), deletsioon (0)	[0,4 - 0,59]; Mediaan: 0,45	0	0	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu

Proovi GM12878 sekveneerimise tulemusi võrreldi NA12878 suure usaldusväärsusega genotüübiga, mille on kindlaks määranud riiklik standardite ja tehnoloogia instituut (National Institutes of Standards and Technology, NIST; v.2.19). 8009 sihtmärki 9232 sihtmärgist sisaldusid täielikult suure usaldusväärsusega genoomsetes piirkondades, 776 sihtmärgil oli osaline kattuvus ja 447 sihtmärgil puudus kattuvus NIST järjestuses. See tulemus andis võrdluseks 1 831 483 koordinaati replikaadi kohta. Mittevariantse aluse nimetusi võrreldi inimgenoomi referentsjärjestuse järguga hg19. Täpsuse tulemused on näidatud jaotises [Proovi GM12878 mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus NIST andmebaasiga leheküljel 65](#).

tabel 24 Proovi GM12878 mooduliga Somatic saadud andmete ühtivus NIST andmebaasiga

Proov	Käsitletud sihtmärkide arv	Autosoomi kutsutavus	TP	VN	TN	VP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Selle kaheksateistkümneme käitusega mooduli Somatic uuringu andmete põhjal saab seadmega NovaSeq 6000Dx seade järjekindlalt sekveneerida järgmist:

- GC sisaldus $\geq 20\%$ (kõik nimetatud alused 1692 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 20% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 0,34%)
- GC sisaldus $\leq 86\%$ (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis GC sisaldusega 86% nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 4,21%)
- PolüA pikkused ≤ 46 (14550082 alust 14550083 alusest 846-s sekveneeritud amplikonis, kus 46 PolüT kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 4,18%)
- PolyT pikkused ≤ 40 (12833489 alust 12833491 alusest 846-s sekveneeritud amplikonis, kus 40 polüT kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 4,37%)
- PolüG pikkused ≤ 11 (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis 11 PolyG kordusega nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 7,59%)
- PolyC pikkused ≤ 8 (9405604 alust 9405615 alusest 5922-s sekveneeritud amplikonis, kus 8 PolüC kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 4,68%)
- Dinukleotiidi korduse pikkused $\leq 31x$ (30996684 alust 30996712 alusest 846-s sekveneeritud amplikonis, kus 31 dinukleotiidi kordust on õigesti määratud ja nimetuse puudumise määr oli 4,04%)
- Trinukleotiidi korduse pikkused $\leq 23x$ (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis 23 trinukleotiidi kordusega nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 5,39%)
- Insertiooni pikkused ≤ 18 (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis 18 insertiooniga nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 1,44%)
- Deletsiooni pikkused ≤ 21 (kõik nimetatud alused 846 sekveneeritud amplikonis 21 deletsiooniga nimetati õigesti ja nimetuse puudumise määr oli 7,86%)

Kordustäpsus

Seadme NovaSeq 6000Dx seade täpsust hinnati Platinum Genome'i proovidega, kasutades representatiivset analüüsi, mis on ette nähtud mitmesuguste geenide uurimiseks 1 970 505 bp ulatuses 23 eri kromosoomis, kasutades 9232 oligonukleotiidi. Kokku hinnati 1723 sihitud väikest varieeruvust (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid). Iduliini testimine koosnes üheteistkümnest või kaheteistkümnest nelja unikaalse Platinum Genome proovi replikaadist. Somaatiline testimine koosnes üheteistkümnest või kaheteistkümnest nelja ainulaadse FFPE-ga töödeldud Platinum Genome'i proovi replikaadist erinevatel VAF tasemetel. Prooviteegid valmistati ette Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx komplekti reagentidega.

Testimine viidi läbi ühes sisemises asukohas, kasutades kolme NovaSeq 6000Dx seade, kolme partiid NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) ja NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) ning kahte operaatorit kuuel alguspäeval. Igal alguspäeval sekveneeriti iduliiniproovi teegid seadme ühel küljel, kasutades S2 reagente, ning DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu ning somaatiliste proovide teegid sekveneeriti teisel seadme poolel, kasutades S4 reagente ning DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu. Analüüs andis tulemuseks 18 läbivooluküveti iga idutee ja somaatilise töövooga kohta.

Moodul Germline

Iduliini käitamisel raporteeritakse genoomilised asukohad, kus tuvastatakse sihtmärgiks olev iduliinivariant, positiivsetena (variant). Eeldatavate positiivsete iduliinivariantide puhul hinnati andmeid nimetamatus määra ja positiivsete nimetamise protsendi (PPC) kohta igas varianti tüübis (SNV, insertioon, deletsioon).

[Laborisisesed iduteeliinipõhised täpsussignaali vaatlused eeldatavate positiivsete tulemuste kohta variandi tüübi järgi leheküljel 66](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 25 Laborisisesed iduteeliinipõhised täpsussignaali vaatlused eeldatavate positiivsete tulemuste kohta variandi tüübi järgi

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud positiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insertioon	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Deletsioon	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Positiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus tuvastatakse variant.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Genoomilised asukohad, kus sihtvarianti ei tuvastatud, raporteeritakse negatiivsetena (metsik tüüp).

Eeldatavate negatiivsete asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumise määra ja negatiivsete

nimetamise protsendi (PNC) põhjal. [Laborisestest iduliinipõhiste signaalide täpsusnäitajad eeldatavate negatiivsete tulemuste kohta leheküljel 67](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 26 Laborisestest iduliinipõhiste signaalide täpsusnäitajad eeldatavate negatiivsete tulemuste kohta

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud negatiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Metsiktüüpi	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Negatiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus varianti ei tuvastatud.

³ Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Iga parameetri (seade, reagentipartii, päev, teegi replikaat) panus üldisele varieeruvusele määrati variatsioonikomponendi analüüsiga, kasutades vastusemuutujana variantsagedust. Üldine standardhälve oli keskmiselt 0,0370. Suurim varieeruvuse põhjustaja oli teegi ettevalmistuste replikaatidel, mis moodustasid 17,1% üldisest varieeruvusest. Päeva panus oli 1%, samas kui seadme ja reagenti partii panus kokku oli vähem kui 1% kogu varieeruvusest [Laborisestest täpsuse varieeruvuse komponentide hinnangud iduliini proovi varieeruvussageduste jaoks leheküljel 67](#) (SD = standardhälve).

tabel 27 Laborisestest täpsuse varieeruvuse komponentide hinnangud iduliini proovi varieeruvussageduste jaoks

Komponent	Keskmine standardhälve	Keskmine % kogu standardhälbest
Päev	0,0020	1,028
Seade	0,0018	0,837
Tarbitav partii	0,0016	0,712
Teegi replikaat	0,0143	17,110
Kokku	0,0370	100

Moodul Somatic

Somaatiliste käituste puhul raporteeritakse positiivsetena genoomi asukohad, kus tuvastatakse sihtmärgiks olev somaatiline variant (variant). Lahjendatud proovide GM12877-13 ja GM12878-13 puhul eeldatavalt positiivsete somaatiliste variantidega VAF-ide puhul vahemikus 6,5% kuni 13%, hinnati andmeid signaalituse määra ja positiivsete signaalide osakaalu (PPC) suhtes igas variandi tüübis (SNV, insertsioon, deletsioon). [Laborisestest somaatiliste nimetuste täpsusnäitajad eeldatavate positiivsete tulemuste kohta variandi tüübi järgi \(VAF on \$\geq 6,5\%\$ ja \$\leq 13\%\$ \) leheküljel 68](#) võtab kokku täheldatud määrad koos alumise ja ülemise 95% usaldusnivooga (LCL/UCL), mis on arvutatud iga variandi tüübi puhul Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 28 Laborisisesed somaatiliste nimetuste täpsusnäitajad eeldatavate positiivsete tulemuste kohta variandi tüübi järgi (VAF on $\geq 6,5\%$ ja $\leq 13\%$)

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud positiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insertsioon	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Deletsioon	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Positiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus tuvastatakse variant.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Genoomilised kohad, kus sihitud somaatilist varianti ei tuvastatud, raporteeritakse negatiivsetena (metsik tüüp). Eeldatavate negatiivsete asukohtade korral hinnati andmeid nimetamatuse määra ja negatiivsete nimetamiste protsendi suhtes. [Laborisisesed somaatiliste nimetuste täpsusnäitajad eeldatavate negatiivsete tulemuste kohta leheküljel 68](#) võtavad kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 29 Laborisisesed somaatiliste nimetuste täpsusnäitajad eeldatavate negatiivsete tulemuste kohta

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud negatiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Metsiktüüpi	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Negatiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus varianti ei tuvastatud.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Iga parameetri (seade, reagendipartii, päev, teegi replikaat) panus üldisele varieeruvusele määrati variatsioonikomponendi analüüsiga, kasutades vastusemuutujana variantsagedust. Üldine standardhälve oli keskmiselt 0,0062. Teegi ettevalmistuse replikaadid jäid kõige olulisemaks varieeruvuse allikaks, moodustades koguhulgast 50,7%. Päev, seade ja kulutarvikute partii panustasid kokku vähem kui 1% kogu varieeruvusest [Laborisese täpsuse varieeruvuse komponentide hinnang somaatiliste proovide varieeruvussageduste jaoks leheküljel 68](#) (SD = standardhälve).

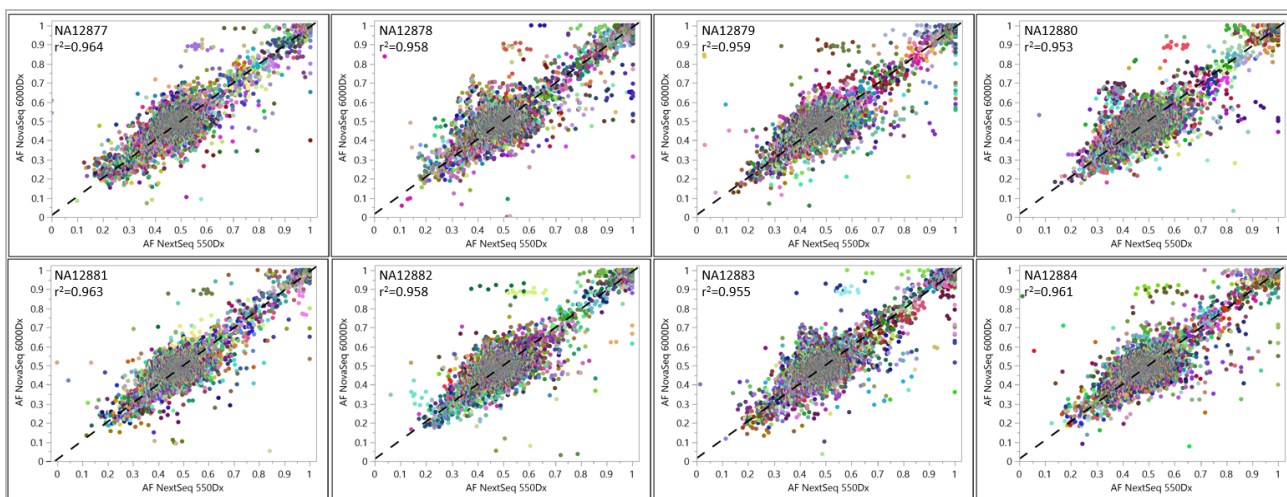
tabel 30 Laborisese täpsuse varieeruvuse komponentide hinnang somaatiliste proovide varieeruvussageduste jaoks

Komponent	Keskmine standardhälve	Keskmine % kogu standardhälbest
Päev	0,0002	0,41
Seade	0,0002	0,40
Tarbitav partii	0,0002	0,35
Teegi replikaat	0,0044	50,7
Kokku	0,0062	100

Meetodi võrdlus

Teostati uuring, et võrrelda instrumentide NovaSeq 6000Dx ja NextSeq 550Dx sooritust. Vereproovide varieeruva sageduse vastavust hinnati, kasutades representatiivset analüüsi, mis on loodud erinevate geenide päringuks, mis hõlmasid 1 970 505 alust kõigis 23 inimese kromosoomis. Testiti kaheksat Platinum Genome'i DNA proovi, seitset kuue replikaadiga ja ühte (NA12881) viie replikaadiga. Teegid sekveneeriti seadmel NovaSeq 6000Dx seade kasutades DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise analüüsi töövoogu, ning seadmel NextSeq 550Dx, kasutades DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager moodulit. *Varieeruva sageduse korrelatsiooni diagrammid (Punktid on värvitud vastavalt unikaalsetele variantidele. Variantid võivad olla igal diagrammil erinevalt värvitud.)* leheküljel 69 toovad välja VAF-korrelatsiooni kahe seadme vahel iga proovi puhul. Seadmete NovaSeq 6000Dx seade ja NextSeq 550Dx vahelise tugeva korrelatsiooni põhjal määratakse, et eelanalüütiliste teguritega seotud toimivusnäitajad (nt eraldamismeetodid või segavad ained) kehtivad mõlemale seadmele. Lisateavet vt Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx pakendi infolehtelt.

joonis 15 Varieeruva sageduse korrelatsiooni diagrammid (Punktid on värvitud vastavalt unikaalsetele variantidele. Variantid võivad olla igal diagrammil erinevalt värvitud.)



Korratavus

Seadme NovaSeq 6000Dx seade korratavust hinnati Platinum Genome'i proovidega, kasutades representatiivset analüüsi, mis on ette nähtud mitmesuguste geenide uurimiseks 1 970 505 bp ulatuses 23 eri kromosoomis, kasutades 9232 oligonukleotiidi. Kokku hinnati 1723 sihitud väikest varieeruvust (SNV-d, insertioonid ja deletsioonid). Iduliini testimine koosnes kolmest või neljast replikaadist kaheistkümnepäevase Platinumi prooviga. Somaatiline testimine koosnes viiest või kuuest replikaadist kaheksast päevasest FFPE-ga töödeldud Platinum Genome proovist erinevatel VAF tasemetel. Prooviteegid valmistati ette Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx komplekti reagentidega.

Testimine viidi läbi kolmes välises asutuses, kasutades ühte NovaSeq 6000Dx S2 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid ja ühte NovaSeq 6000Dx S4 reagenti v1.5 komplekt (300 tsükli) partiid. Igas uuringukeskuses kasutati ühte NovaSeq 6000Dx seade vahendit. Igas kohas viisid analüüsi läbi kaks operaatorit. Iga operaator tegi analüüsi kolmel mittejärjestikusel päeval iga proovi tüübiga, kasutades kolmes kohas kokku 36 läbivooluküveti. Iga alguspäeva kohta sekveneeriti iduliiniproovi teegid seadme küljel A, kasutades S2 reagente ja rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu, ning somaatiliste proovide teegid sekveneeriti seadme poolel B, kasutades S4 reagente ning DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu. Analüüs andis tulemuseks 18 läbivooluküveti iga idutee ja somaatilise töövooga kohta.

Moodul Germline

Iduliini käitamisel raporteeritakse genoomilised asukohad, kus tuvastatakse sihtmärgiks olev iduliinivariant, positiivsetena (variant). Eeldatavate positiivsete iduliinivariantide puhul hinnati andmeid nimetamata määra ja positiivsete nimetamiste protsendi (PPC) kohta igas variandi tüübis (SNV, insertioon, deletsioon). [Eeldatavate positiivsete tulemuste iduliini nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi leheküljel 70](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 31 Eeldatavate positiivsete tulemuste iduliini nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud positiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insertioon	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Deletsioon	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Positiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus tuvastatakse variant.

³ Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Genoomilised asukohad, kus sihtvarianti ei tuvastatud, raporteeritakse negatiivsetena (metsik tüüp). Eeldatavate negatiivsete asukohtade korral hinnati andmeid nimetuse puudumise määra ja negatiivsete nimetamiste protsendi (PNC) põhjal. [Eeldatavate negatiivsete tulemuste iduliini signaalide vaatlused leheküljel 70](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 32 Eeldatavate negatiivsete tulemuste iduliini signaalide vaatlused

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud negatiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Metsiktüüpi	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Negatiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus varianti ei tuvastatud.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Moodul Somatic

Somaatiliste käituste puhul raporteeritakse positiivsetena genoomi asukohad, kus tuvastatakse sihtmärgiks olev somaatiline variant (variant). Eeldatavate positiivsete somaatiliste variantide puhul, kus alleeli keskmine variantsagedus (VAF) on 14% või suurem ja 28% või väiksem, hinnati andmeid nimetuste puudumise ja positiivse nimetamise protsendi (PPC) suhtes igas variandi tüübis (SNV, insertioon, deletsioon). [Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi \(keskmine VAF \$\geq\$ 14% ja \$\leq\$ 28%\) leheküljel 71](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 33 Eeldatavate positiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused variandi tüübi järgi (keskmine VAF \geq 14% ja \leq 28%)

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud positiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insertioon	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Deletsioon	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Positiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus tuvastatakse variant.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Genoomilised kohad, kus sihitud somaatilist varianti ei tuvastatud, raporteeritakse negatiivsetena (metsik tüüp). Eeldatavate negatiivsete asukohtade korral hinnati andmeid nimetamatuse määra ja negatiivsete nimetamise protsendi suhtes. [Eeldatavate negatiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused leheküljel 71](#) võtab kokku vaadeldud määrad koos alumise ja ülemise 95% usalduspiiriga (LCL/UCL), mis arvutati iga variandi tüübi kohta Wilsoni skoori meetodit kasutades.

tabel 34 Eeldatavate negatiivsete tulemuste somaatilise nimetuse vaatlused

Variandi tüüp	Täheldatud puuduvad nimetused ¹	Nimetuste koguarv	Puuduvate nimetuste osakaal	Täheldatud negatiivsed nimetused ²	Hinnatavad nimetused kokku	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Metsiktüüp	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Ilma signaalideta määratletud kui sihtkromosoomi asend, kus varianti ei saa määrata (madala sügavuse tõttu).

² Negatiivne signaal määratletud kui sihtkromosoomi asendid, kus varianti ei tuvastatud.

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200025276 v01	September 2022	Täpsusandmed iduliini signaalide vaatluste kohta.
Dokument nr 200025276 v00	August 2022	Esialgne väljalase.

Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2022 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktteave



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



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

Sponsor Austraalias

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

Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiате, kui külastate aadressi support.illumina.com ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumentatsioon).