

Folheto Informativo

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO
APENAS PARA EXPORTAÇÃO

Utilização prevista

O Instrument NovaSeq 6000Dx destina-se à sequenciação de bancos de ADN, quando utilizado com ensaios de diagnóstico *in vitro* (IVD). O Instrument NovaSeq 6000Dx destina-se a ser utilizado com reagentes IVD específicos registados, certificados ou aprovados e com software de análise.

Princípios do procedimento

O Illumina® Instrument NovaSeq 6000Dx destina-se à sequenciação de bancos de ADN, com ensaios de diagnóstico *in vitro*. Para a entrada, o NovaSeq 6000Dx utiliza as bibliotecas geradas do ADN em que os índices de amostras e as sequências de captura serão adicionadas aos alvos amplificados. As bibliotecas de amostra são capturadas numa célula de fluxo e sequenciadas no instrumento utilizando a química de sequenciação por síntese (SBS). A química SBS utiliza um método de terminador reversível para detetar bases únicas de nucleótidos com marcação fluorescente à medida que são incorporadas em cadeias de ADN crescentes. O Real-Time Analysis Software (RTA) executa uma análise da imagem e uma identificação de bases e atribui uma pontuação de qualidade a cada base de cada ciclo de sequenciação. Quando a análise primária terminar, a análise secundária pode ser executada no Illumina DRAGEN Server para NovaSeq 6000Dx incluído e necessário, para processar identificações de bases. O NovaSeq 6000Dx utiliza diferentes aplicações de análise secundária consoante o fluxo de trabalho. Para a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, o processamento inclui demultiplexação, geração de ficheiros FASTQ, alinhamento, identificação de variantes e criação de ficheiros em formato de identificação de variantes (VCF e gVCF). Os ficheiros VCF e gVCF contêm informação contida sobre variantes da linha germinal ou somática (dependendo do fluxo de trabalho) encontradas em posições específicas num genoma de referência.

Funcionamento bimodal

O NovaSeq 6000Dx inclui um único disco rígido de arranque, com modos separados de diagnóstico *in vitro* (IVD) e utilização exclusiva para investigação (RUO). O modo é selecionado utilizando o alternador no ecrã Sequencing. O modo selecionado é rotulado claramente na interface em todos os ecrãs. Os ensaios de sequenciação de IVD, incluindo a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nos fluxos de trabalho da linha germinal e/ou somáticos, são executados no modo IVD. Apenas os reagentes de sequenciação IVD podem ser utilizados no modo de IVD. As características de desempenho e as limitações de procedimento do NovaSeq 6000Dx foram estabelecidas utilizando a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no modo IVD.

Limitações do procedimento

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*, apenas.
2. A aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, quando utilizada com o Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e o Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos), é capaz de proporcionar:
 - Saída de sequenciação:
 - ≥ 1.0 terabases (TB) com o kit S2
 - ≥ 3.0 terabases (TB) com o kit S4
 - Comprimento de leitura (em ensaios de extremidade emparelhada) 2 x 150 pares de bases (bp).
 - Bases superiores a Q30 $\geq 85\%$ a um comprimento de leitura de 2 x 150 bp. Identificações de base iguais ou superiores a 85% têm pontuações de qualidade na escala Phred superiores a 30, indicando uma precisão da identificação de bases superior a 99,9%.
3. Inserções de comprimento > 18 bp e eliminações de comprimento > 21 bp não foram validadas.
4. Variantes maiores, incluindo variantes de multinucleótidos (MNVs) e indels grandes, podem ser reportados como variantes separadas mais pequenas no ficheiro de saída VCF.
5. Podem ser referenciados como variantes separadas mais pequenas no ficheiro de saída VCF.
6. As eliminações são reportadas no ficheiro VCF na coordenada que antecede a base de acordo com o formato VCF. Assim, devem ser consideradas as variantes adjacentes antes de reportar que uma identificação individual de base é uma referência homozigótica.
7. Limitações específicas do Germline:
 - O NovaSeq 6000Dx, utilizando o módulo Germline FASTQ e o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, foi concebido para fornecer resultados qualitativos para a identificação da variante da linha germinal (p. ex., homozigótica, heterozigótica, de tipo selvagem).
 - O número de cópia da variação pode afetar a identificação de uma variante como homozigótica ou heterozigótica.
 - O sistema não comunicará mais de duas variantes para um locus único, mesmo na presença de uma variação do número de cópias.
8. Limitações específicas do Somatic:
 - O NovaSeq 6000Dx, utilizando o módulo Somatic FASTQ o fluxo de trabalho produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foi concebido na aplicação para fornecer resultados qualitativos para a identificação da variante da linha germinal (p. ex., homozigótica, heterozigótica, de tipo selvagem).

- O fluxo de trabalho Somatic FASTQ e de produção de análises VCF não consegue distinguir entre variantes de linha germinal e somáticas. O fluxo de trabalho foi concebido para detetar variantes ao longo de um intervalo de frequências de variantes, mas a frequência de variantes não pode ser utilizada para distinguir entre variantes somáticas e variantes de linha germinal.
- O tecido normal na amostra afeta a deteção de variantes. O limite de deteção reportado é baseado numa frequência de variantes relativa ao ADN total extraído de tecido tumoral e tecido normal.
- Se mais de um alelo de variante for chamado para o mesmo locus, nenhum dos alelos será comunicado como variantes de passagem. Em vez disso, o conjunto integral de alelos será comunicado, mas filtrado via etiqueta com vários alelos.

Procedimentos de controlo de qualidade

O software NovaSeq 6000Dx avalia cada ensaio, amostra e identificação de bases em relação às métricas de controlo de qualidade. Os controlos positivo e negativo são recomendados na preparação de bancos e devem ser avaliados. Avalie os controlos como segue.

- Controlo negativo (sem controlo de modelos) ou outro controlo negativo — deve produzir o resultado esperado. Se o controlo negativo gerar um resultado diferente do esperado, poderá ter ocorrido um erro no controlo de amostras, um registo incorreto dos primers de indexação ou contaminação.
- Amostra de controlo positivo — tem de gerar o resultado esperado. Se o controlo positivo gerar um resultado diferente do esperado, poderá ter ocorrido um erro no controlo de amostras ou um registo incorreto dos primers de indexação.

Componentes do produto

O Illumina da NovaSeq 6000Dx é composto pelo seguinte:

1. Instrument NovaSeq 6000Dx (Catálogo n.º 20068232)
2. Componentes do software do Instrument NovaSeq 6000Dx, incluindo o seguinte:

Aplicação de software	Local da instalação	Função	Descrição
Software Operacional NextSeq	NovaSeq 6000Dx	Controla o funcionamento do instrumento	A Software Operacional NextSeq (NVOS) gere o funcionamento do instrumento durante uma sequenciação e gera imagens para serem utilizadas pelo software Real-Time Analysis (RTA).

Aplicação de software	Local da instalação	Função	Descrição
Real-time Analysis Software (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Executa análise primária	A aplicação de software RTA converte as imagens geradas pelo NVOS de cada secção por ciclo de ensaio de sequenciação em ficheiros de identificação de bases. Os ficheiros de identificação de bases são entradas para os módulos da aplicação no Illumina DRAGEN Server para NovaSeq 6000Dx. A aplicação de software RTA não inclui uma interface do utilizador.
Illumina Run Manager	Illumina DRAGEN Server	A preparação e gestão dos controlos do ensaio	Illumina Run Manager permite a gestão de utilizadores e instrumento, aloja o software da aplicação e permite a utilização dos módulos de hardware acelerados de análise genómica secundária DRAGEN.

Condições de funcionamento

Para mais informações sobre as condições de funcionamento, consulte a secção de Considerações ambientais no *NovaSeq 6000Dx Instrument, Documentação do produto*.

Elemento	Especificação
Temperatura	Mantenha a temperatura do laboratório entre os 19 °C e os 25 °C (22 °C ±3 °C). Esta temperatura é o intervalo de temperatura de funcionamento do instrumento. Durante uma execução, não permita que a temperatura ambiente varie mais do que ±2 °C.
Humidade	Mantenha uma humidade relativa sem condensação entre os 20 e os 80%. O sistema deve funcionar com uma elevação funcional de 2000 metros ou inferior.

Consumíveis e equipamento

Esta secção lista tudo o que é necessário para um ensaio de sequenciação NovaSeq 6000Dx. Isto inclui consumíveis fornecidos pela Illumina e acessórios e equipamento que deve comprar de outros fornecedores. Estes itens são necessários para concluir o protocolo e efetuar a manutenção e os procedimentos de resolução de problemas.

Para obter informação sobre os símbolos nos consumíveis ou embalagem de consumíveis, consulte [Illumina IVD Symbol Key \(documento n.º 1000000039141\)](#).

Consumíveis de sequenciação

Um ensaio NovaSeq 6000Dx requer os seguintes componentes:

- Cartucho tampão
- Cartucho cluster
- Célula de fluxo
- Tubo para o banco
- Cartucho SBS

Os consumíveis NovaSeq 6000Dx são embalados nas seguintes configurações. Cada componente utiliza a identificação por radiofrequência (RFID) para o controlo e a compatibilidade exatos dos consumíveis.

Tabela 1 Consumíveis fornecidos pela Illumina

Nome do kit	Conteúdo	Número do catálogo Illumina
Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos)	Cartucho Cluster S2 Célula de Fluxo S2 Cartucho SBS S2	20046931
Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos)	Cartucho Cluster S4 Célula de Fluxo S4 Cartucho S4 SBS	20046933
Cartucho Tampão S2 NovaSeq 6000Dx	Cartucho Tampão S2	20062292
Cartucho Tampão S4 NovaSeq 6000Dx	Cartucho Tampão S4	20062293
Tubo para bancos NovaSeq 6000Dx	Um tubo para bancos	20062290
Tubos para bancos, pacote de 24 NovaSeq 6000Dx	24 tubos para bancos	20062291

Quando receber os seus consumíveis, armazene de imediato os componentes à temperatura indicada para garantir o desempenho adequado.

Tabela 2 Armazenamento de Kits NovaSeq 6000Dx



Consumível	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Comprimento	Largura	Altura
Célula de fluxo	1	2 °C a 8 °C	27,7 cm (10,9 pol.)	17 cm (6,7 pol.)	3,8 cm (1,5 pol.)
Cartucho cluster	1	-25 °C a -15 °C	29,5 cm (11,6 pol.)	13 cm (5,1 pol.)	9,4 cm (3,7 pol.)
Cartucho SBS	1	-25 °C a -15 °C	30 cm (11,8 pol.)	12,4 cm (4,9 pol.)	11,2 cm (4,4 pol.)

Consumível	Quantidade	Temperatura de armazenamento	Comprimento	Largura	Altura
Cartucho tampão	1	15 °C a 30 °C	42,2 cm (16,6 pol.)	20,6 cm (8,1 pol.)	21,1 cm (8,3 pol.)
Tubo para o banco	1	15 °C a 30 °C	4,1 cm (1,6 pol.)	2,3 cm (0,9 pol.)	12,4 cm (4,9 pol.)

Detalhes dos consumíveis

Para identificar componentes compatíveis do kit, as células de fluxo e os cartuchos são rotulados com símbolos que mostram o modo de kit.

Tabela 3 Etiquetas de compatibilidade

Modo kit	Marcação na etiqueta	Descrição
Componentes do kit S2		As células de fluxo S2 produzem até 4,1 mil milhões de leituras simples que passam o filtro com uma saída até 1000 Gb a 2 x 150 bp. As células de fluxo S2 facultam uma sequenciação rápida para a maior parte das aplicações com elevada produtividade.
Componentes do kit S4		As células de fluxo S4 produzem até 10 mil milhões de leituras simples que passam o filtro com uma saída até 3000 Gb a 2 x 150 bp. A célula de fluxo S4 é uma versão da célula de fluxo de quatro pistas, concebida para uma produção máxima.

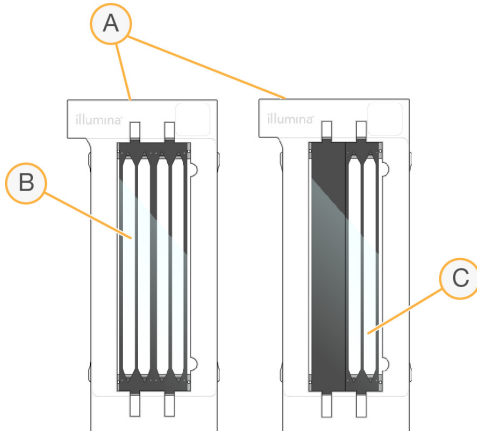
Célula de fluxo

A NovaSeq 6000Dx célula de fluxo é a típica célula num cartucho da célula de fluxo. A célula de fluxo é um substrato à base de vidro, contendo mil milhões de poços nano num mecanismo organizado. Os clusters são gerados nos poços nano, a partir dos quais a sequenciação é realizada.

Cada célula de fluxo tem várias pistas para sequenciar bancos pooled. A célula de fluxo S2 tem duas pistas e S4 tem quatro. Cada pista tem uma imagem em várias faixas, dividindo o software a imagem em cada faixa em partes mais pequenas chamadas blocos.

Algumas fissuras e outros defeitos menores cosméticos na célula de fluxo são normais e não se espera que comprometam a qualidade e a produtividade dos dados. A Illumina recomenda a utilização destas células de fluxo como normais.

Figura 1 Células de fluxo



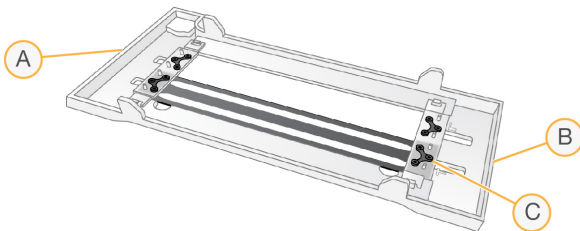
- A. Cartucho de célula de fluxo
- B. Célula de fluxo de quatro pistas (S4)
- C. Célula de fluxo de duas pistas (S2)

A parte de baixo de cada célula de fluxo tem vários vedantes. Os bancos e os reagentes introduzem as pistas de uma célula de fluxo, através de vedantes na sua extremidade de entrada. Os reagentes usados são expulsos das pistas através dos vedantes na extremidade de saída.

**ATENÇÃO**

Evite tocar nos vedantes, ao lidar com a célula de fluxo.

Figura 2 Célula de fluxo invertida



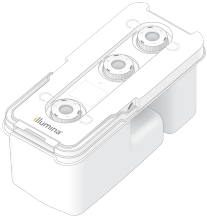


- A. Extremidade de saída
- B. Extremidade de entrada
- C. Vedante (um de quatro)

Tampão, cluster e detalhes dos cartuchos SBS e Cluster

Os cartuchos tampão NovaSeq 6000Dx, cluster e SBS têm reservatórios com película selante pré-cheios com reagentes, tampões e solução de lavagem. Cluster e cartuchos SBS estão incluídos nos kits de reagentes NovaSeq 6000Dx. O cartucho de tampão é vendido separadamente.

Os cartuchos são colocados diretamente no instrumento e são codificados e rotulados para reduzir os erros da carga. Guias na unidade de refrigeração do reagente e gavetas do tampão garantem uma orientação adequada.

Tabela 4 Cartuchos NovaSeq 6000Dx

Consumível	Descrição
Cartucho tampão 	<p>Pré-preenchido com a sequência de tampão e pesos até 6,8kb (15 lb). Um manípulo em plástico facilita o transporte, carga e descarga.</p> <p>O cartucho tampão contém reagentes que são sensíveis à luz. Mantenha o tampão embalado até à utilização.</p>
Cartucho cluster 	<p>Cheio previamente com reagentes de indexação, clustering e extremidades emparelhadas e solução de lavagem. Inclui uma posição designada para o tubo para o banco. A rotulagem laranja distingue o cartucho cluster do SBS.</p> <p>Um reagente de desnaturação na posição n.º 30 contém formamida, que é uma amida orgânica e toxina reprodutiva. Para facilitar a eliminação segura de qualquer reagente não usado após o ensaio de sequenciação, este reservatório é amovível.</p>
Cartucho SBS 	<p>Pré-cheio com reagentes de sequenciação em volumes específicos para o número de ciclos que o kit suporta. Cada uma das três posições de reagentes tem uma posição adjacente reservada para a lavagem automática pós-ensaio. A rotulagem cinzenta distingue o cartucho SBS do cluster.</p> <p>O cartucho SBS contém reagentes que são sensíveis à luz. Mantenha o SBS no invólucro até à sua utilização.</p>

Reservatórios reservados para cartuchos cluster

Três reservatórios são reservados para primers personalizados, sendo reservada uma posição para o tubo para o banco. Para efeitos de rastreabilidade, o tubo para o banco é carregado no cartucho cluster, durante a preparação do ensaio e permanece com ele até ao fim do ensaio.

Figura 3 Reservatórios numerados

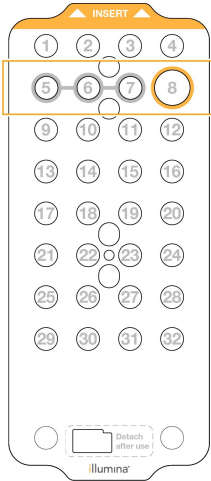


Tabela 5 Reservatórios para cartuchos cluster

Posição	Reservada para
5, 6 e 7	Primers personalizados opcionais
8	Tubo para o banco

Consumíveis e equipamento fornecidos pelo utilizador

Tabela 6 Consumíveis

Consumível	Fornecedor	Finalidade
Garrafa para centrífugadora, 500 ml	Fornecedor geral do laboratório	Diluting Tween 20, para uma lavagem de manutenção.
Tubo para centrífugadora, 30 ml	Fornecedor geral do laboratório	Diluting NaClO, para uma lavagem de manutenção.
Luvas descartáveis, sem pó	Fornecedor geral do laboratório	Uso geral.
Toalhetes de álcool isopropílico a 70% ou Toalhetes de álcool etanol a 70%	VWR, catálogo n.º 95041-714 ou equivalente Fornecedor geral do laboratório	Componentes de limpeza, antes de um ensaio e em geral.
Pano de laboratório, libertação reduzida de pelo	VWR, catálogo n.º 21905-026 ou equivalente	Secagem da estrutura da célula de fluxo e para fins gerais.

Consumível	Fornecedor	Finalidade
Reagente NaClO a 5%	Sigma-Aldrich, catálogo n.º 239305	Realizar uma lavagem de manutenção.
Pontas de pipeta, 2 µl	Fornecedor geral do laboratório	Pipetar para diluir e carregar bancos.
Pontas de pipeta, 20 µl	Fornecedor geral do laboratório	Pipetar para diluir e carregar bancos.
Pontas de pipeta, 200 µl	Fornecedor geral do laboratório	Pipetar para diluir e carregar bancos.
Pontas de pipeta, 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório	Pipetar para diluir e carregar bancos.
Reagente ou álcool isopropílico de grau espectrofotométrico ou (99%), frasco de 100 ml	Fornecedor geral do laboratório	Limpeza periódica de componentes óticos e auxiliar na limpeza do cartucho.
Tween 20	Sigma-Aldrich, catálogo n.º P7949	Realizar uma lavagem de manutenção.
Água, grau laboratorial	Fornecedor geral do laboratório	Diluting Tween 20 e hipoclorito de sódio, para uma lavagem de manutenção.

Tabela 7 Equipamento

Item	Origem
Congelador, -25 °C a -15 °C	Fornecedor geral do laboratório
Cilindro graduado, 500 ml, estéril	Fornecedor geral do laboratório
Balde para gelo	Fornecedor geral do laboratório
Pipeta, 20 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pipeta, 200 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pipeta, 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório
Frigorífico, 2 °C a 8 °C	Fornecedor geral do laboratório
Cuba, banhos de água*	Fornecedor geral do laboratório

* Utilize uma cuba que possa acomodar dois cartuchos reagentes e o nível adequado de água. Por exemplo, (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm) (24 pol. × 36 pol. × 10 pol.).

Diretrizes para água laboratorial

Utilize água laboratorial ou desionizada para realizar procedimentos no instrumento. Nunca utilize água da torneira. Utilize apenas água dos seguintes graus ou equivalente:

- Água desionizada
- Illumina PW1
- Água de 18 Megaohms (MΩ)
- Água Milli-Q
- Água Super-Q
- Água para biologia molecular

Instruções de utilização

As seguintes instruções são para execução do Instrument NovaSeq 6000Dx no modo de funcionamento IVD, utilizando as configurações do kit S2 ou S4.

Criar um ensaio de sequenciação

Siga os seguintes passos para criar um ensaio utilizando Illumina Run Manager, nos modos IVD ou RUO. Em alternativa, selecione **Import Run** (Importar ensaio) no separador Planned (Planeado) da página dos ensaios e importe um modelo. Crie novos ensaios no instrumento ou acedendo a Illumina Run Manager, utilizando um navegador num computador ligado à rede.

NOTA A informação exata requer que cada aplicação de análise seja diferente, mas o processo para criar um ensaio inclui os seguintes passos.

1. No separador Planned (Planeado) do ecrã dos ensaios, selecione **Create Runs** (Criar ensaios).
2. Selecione uma aplicação e, em seguida, selecione **Next** (Seguinte).
3. Prossiga através dos ecrãs de predefinições. Dependendo da sua aplicação, os ecrãs mostrados podem incluir o seguinte:
 - **Run Settings** (Definições do ensaio) — Introduza os parâmetros do ensaio.
 - **Sample Data** (Dados de amostra) — Introduza manualmente os dados de amostra ou por importação de um ficheiro CSV contendo a informação da amostra. Os nomes na amostra devem ser exclusivos.
 - **Analysis settings** (Predefinições das análises) — Introduza as predefinições para as análises.
4. No ecrã Review (Analisar), reveja as informações do ensaio e selecione **Save** (Guardar). O ensaio é adicionado no topo da lista de ensaios, no separador Planned (Planeado).

Preparar os consumíveis

Descongelar os cartuchos SBS e Cluster

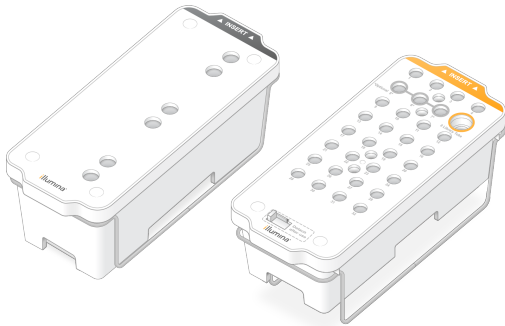


ATENÇÃO

Utilizar água quente para descongelar os reagentes pode levar à perda de qualidade ou insucesso do ensaio.

1. Se estiver em curso um ensaio de sequenciação, certifique-se que ambos os lados do instrumento estão disponíveis, quando o descongelamento estiver concluído.
2. Retire os cartuchos SBS e cluster do armazenamento de -25°C a -15°C .
3. Coloque cada cartucho num rack de descongelação.
Os racks são fornecidos com o instrumento e evitam que se vire no banho de água.

Figura 4 Cartuchos nos racks de descongelação



4. Utilize a seguinte tabela para determinar a duração da descongelação.
Descongele os cartuchos SBS e cluster num banho de água à temperatura ambiente (19°C a 25°C), como se indica seguidamente. Submerja os cartuchos aproximadamente até meio.

Cartucho	Duração da descongelação
Cartucho SBS S2	4 horas
Cartucho Cluster S2	Até 2 horas
Cartucho SBS S4	4 horas
Cartucho Cluster S4	Até 4 horas



ATENÇÃO

O não iniciar a sequenciação no prazo de quatro horas do descongelamento dos cartuchos de reagentes pode resultar numa qualidade de dados reduzida.

5. Seque meticulosamente as bases do cartucho utilizando toalhas de papel. Seque entre os furos, para que toda a água seja eliminada.

6. Inspeção a película selante para excluir vestígios de água. Se houver água, seque com um pano que não liberte pelo.
7. Inspeção a parte de baixo de cada cartucho para verificar se os reservatórios estão livres de gelo, o que indica que os reagentes estão congelados.
8. Inverta cada cartucho 10 vezes para misturar os reagentes.

**ATENÇÃO**

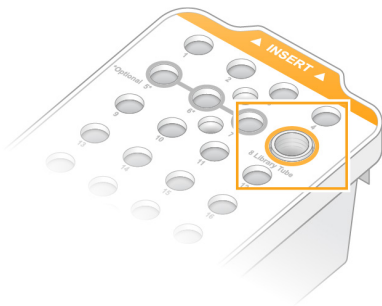
O não inverter meticulosamente os cartuchos pode resultar numa qualidade de dados reduzida.

9. Bata levemente a parte inferior de cada cartucho na bancada, para reduzir as bolhas de ar.

Coloque o tubo para o banco

1. Sem perturbar o banco na parte inferior, insira um tubo para o banco sem tampa contendo um pool de bancos desnaturado e diluído no **Library Tube** (Tubo para o banco) posição (n.º 8) do cartucho cluster.
2. Coloque o tubo para o banco na posição n.º 8 do cartucho cluster.

Figura 5 Tubo para o banco sem tampa colocado na posição n.º 8

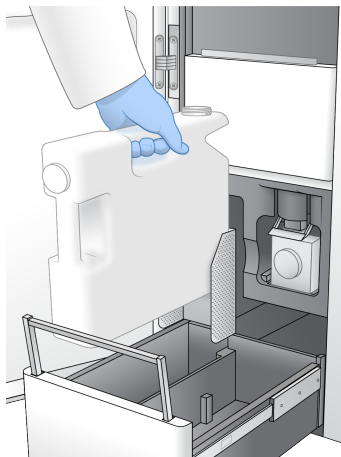
**Vazar as embalagens de reagentes usadas**

Utilize as seguintes instruções para esvaziar as embalagens de reagentes usadas em *todos* os ensaios de sequenciação. Se o seu sistema está configurado para encaminhar os reagentes usados externamente, a embalagem mais pequena recolhe os reagentes usados, devendo ser esvaziada em cada ensaio de sequenciação. A embalagem grande deve estar colocada.

1. Retire e esvazie a embalagem pequena de reagentes usados, como se indica seguidamente.
 - a. Levante a alavanca e retire do recanto a embalagem pequena de reagentes usados. Agarre a embalagem por ambos os lados.
 - b. Retire a tampa roscada do suporte, na parte da frente da embalagem.
 - c. Feche a garrafa com a tampa para evitar salpicos.

- d. Mantenha o conteúdo separado do conteúdo da outra garrafa, elimine de acordo com as normas aplicáveis na sua região.
 - e. Volte a colocar a embalagem sem tampa no recanto dela e alivie a alavanca. Guarde a tampa no respetivo suporte.
2. Retire e esvazie a embalagem grande de reagentes usados, como se indica seguidamente.
- a. Utilizando o manípulo de cima, retire a embalagem grande de reagentes usados do lado esquerdo da gaveta do tampão.
 - b. Retire a tampa roscada do suporte, na parte da frente da embalagem.
 - c. Feche a garrafa com a tampa para evitar salpicos.
 - d. Elimine os conteúdos de acordo com as normas aplicáveis na sua região. Agarre ambos os manípulos ao esvaziar.
 - e. Volte a colocar a embalagem sem tampa na gaveta do tampão. Guarde a tampa no respetivo suporte.

Figura 6 Retornando à embalagem vazia



3. Calce um novo par de luvas sem pó.



ATENÇÃO

Calce sempre um novo par de luvas, após manusear a embalagem de reagentes usados.

4. Feche a gaveta do tampão e depois as portas do compartimento do líquido.



ATENÇÃO

O não esvaziar as embalagens de reagente usadas pode resultar num ensaio interrompido e derrame do excedente, o que danifica o instrumento e constitui um risco de segurança.

Preparar células de fluxo

1. Retire uma nova embalagem encaixotada de célula de fluxo do armazenamento de 2 °C a 8 °C.
2. Reserve a embalagem selada da célula de fluxo a temperatura ambiente (19 °C a 25 °C) por 10 a 15 minutos. Utilize a célula de fluxo no prazo de 12 horas após tê-la retirado da embalagem.

Carregar consumíveis

Utilize as seguintes instruções para iniciar a preparação do ensaio e para carregar consumíveis.

1. No menu principal, selecione **Sequence** (Sequenciação), e depois ensaio de células de fluxo único ou duplo, como segue.
 - **A+B** — Prepara um ensaio de células de fluxo duplo.
 - **A** — Prepara um ensaio de células de fluxo simples, no lado A.
 - **B** — Prepara um ensaio de células de fluxo simples, no lado B.O sistema inicia a preparação do ensaio, começando por carregar as células de fluxo.
2. Selecione **OK** para confirmar o aviso e abra a porta das células de fluxo.



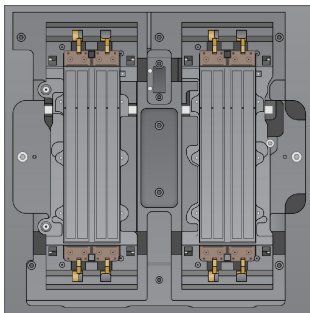
ATENÇÃO

Mantenha a superfície livre durante o ensaio de sequenciação e evite inclinar-se sobre o instrumento. Fazer pressão na porta das células de fluxo pode abri-la, o que interrompe o ensaio. Não é possível retomar um ensaio parado.

Carregar a célula de fluxo

1. Se presente, remova a célula de fluxo do ensaio anterior.
2. Se forem visíveis partículas na estrutura das células de fluxo, limpe toda a estrutura, incluindo a interface fluidica e a superfície em vidro do alinhamento ótico do alvo, com um toallete com álcool. Seque com um pano que não liberte pelo.

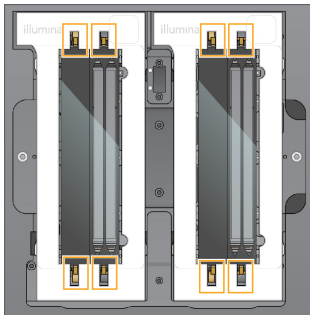
Figura 7 Estrutura da célula de fluxo



3. Remova a célula de fluxo da embalagem, como se indica seguidamente.

- a. Ponha um novo par de luvas sem pó, para evitar a contaminação da superfície em vidro da célula de fluxo.
 - b. Com a embalagem em cima de uma superfície plana, retire a película a partir do separador do canto.
 - c. Retire a embalagem de plástico transparente que cobre a célula de fluxo.
 - d. Retire a célula de fluxo da embalagem. Agarre a célula de fluxo pelas laterais, para evitar tocar no vidro ou na parte de baixo dos vedantes.
 - e. Se houver partículas visíveis numa das superfícies de vidro, limpe a superfície em questão com um toalhete de álcool que não liberte pelo e seque-a com um pano que liberte pouco pelo.
 - f. Elimine a embalagem adequadamente.
4. Alinhe a célula de fluxo com os quatro pinos de alinhamento e coloque a célula de fluxo na estrutura.

Figura 8 Células de fluxo carregadas alinhadas nos pinos



5. Selecione **Close Flow Cell Door** (Fechar porta da célula de fluxo).
A porta da célula de fluxo fecha-se, os sensores e o RFID estão confirmados e o ID da célula de fluxo é apresentado no ecrã.

Coloque os cartuchos SBS e Cluster

1. Abra as portas do compartimento do líquido e, em seguida, abra a porta da unidade de refrigeração de reagentes.
2. Retire os cartuchos SBS e cluster usados, se estiverem presentes do ensaio anterior.
Os cartuchos usados perfuraram a película selante.
3. Elimine o conteúdo não usado de acordo com as normas aplicáveis.
Para uma eliminação segura da posição n.º 30 do cartucho cluster, consulte [Desprender a posição n.º 30 na página 21](#).

4. Insira os cartuchos preparados na gaveta da unidade de refrigeração de reagentes, como se indica a seguir, para que as etiquetas Insert fiquem voltadas para a parte de trás do instrumento.
 - Coloque o cartucho SBS (etiqueta cinzenta) na posição esquerda.
 - Coloque o cartucho cluster (etiqueta laranja) com um tubo para o banco sem tampa, na posição direita.

Figura 9 Cartuchos de reagentes colocados

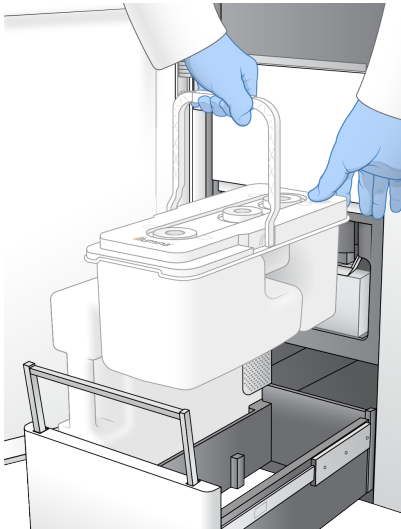


5. Deslize a gaveta na unidade de refrigeração e, em seguida, feche a porta da unidade de refrigeração de reagentes.
Os sensores e os RFID são verificados. Os ID do tubo para o banco e dos dois cartuchos aparecem no ecrã.

Colocar o cartucho de tampão

1. Puxe o manípulo de metal para abrir a gaveta do tampão.
2. Retire o cartucho de tampão usado do lado direito da gaveta do tampão.
O cartucho tampão usado perfurou a película selante.
3. Coloque um novo cartucho tampão na respetiva gaveta, para que a etiqueta Illumina fique de frente para a gaveta. Alinhe o cartucho com as guias salientes na base e nos lados da gaveta.
Quando devidamente instalado, o cartucho tampão é inserido uniformemente e a gaveta pode fechar.

Figura 10 Colocar o cartucho de tampão



4. Se ambas as embalagens de reagentes estiverem vazias, selecione a caixa de seleção que confirme que ambas as embalagens de reagente usadas estão vazias.

NOTA O não esvaziar as embalagens de reagente usadas pode resultar num ensaio interrompido e derrame do excedente, o que danifica o instrumento e constitui um risco de segurança.

5. Quando os consumíveis tiverem sido adicionados, selecione **Run Selection** (seleção de ensaio) para prosseguir.

Selecionar e iniciar um ensaio

O instrumento analisa o ID do tubo para bancos e pesquisa um ensaio planeado correspondente.

1. Se for encontrado um ensaio planeado que corresponda ao ID do tubo para bancos para cada centro utilizado, é ignorada a seleção do ensaio. Para prosseguir, selecione **Review** (Rever).
2. Se não houver qualquer ensaio correspondente num ou mais centros, selecione **Run Selection** (Correr seleção) e depois um ou mais ensaios planeados.
Não pode ser selecionado o mesmo ensaio planeado em ambos os centros.
3. Quando um ou mais ensaios são selecionados, selecione **Pre-Run Checks** (Verificações pré-ensaio).
4. Aguarde aproximadamente 5 minutos para as verificações pré-ensaio terminarem.
O ensaio começa automaticamente após uma conclusão bem-sucedida.

NOTA Para evitar encher o disco rígido, não copie dados para o disco C:\, após o início do ensaio.

Erros de verificação pré-ensaio

1. Se as verificações pré-ensaio forem goradas devido a um erro de um sensor, como, por exemplo, célula de fluxo não detetada, deve sair e reiniciar o fluxo de trabalho.
2. No caso de outras falhas de verificação no pré-ensaio, selecione **Retry** (Tentar novamente para) reiniciar a verificação não concretizada ou **Retry All** (Tentar novamente todos). Os erros requerem resolução, antes do início do ensaio.
3. Selecione o ícone **Error** (Erro), para ver os detalhes.
4. Se a verificação do alinhamento falhar, resolva o erro como se segue.
 - a. Selecione **Reload** (Recarregar) e depois **OK** para voltar ao ecrã Load.
 - b. Remova os itens do topo do instrumento e depois selecione **OK**. A porta da célula de fluxo abre-se.
 - c. Recarregue a célula de fluxo e depois selecione **Run Setup** (Correr configuração).
 - d. Prossiga através de cada ecrã para reler cada RFID e volte para o ecrã Pre-Run Checks.
 - e. Volte a efetuar a verificação.

Monitorizar o progresso do ensaio






Os seguintes detalhes são mostrados no ecrã Sequencing (sequenciação), enquanto o ensaio está em curso. O ecrã Sequencing (sequenciação) é acedido através do menu principal.

- **Status of individual run steps (Estado dos passos individuais do ensaio)**
- **Time to completion** (tempo até à conclusão) — A data e hora de conclusão do ensaio (aaaa-mm-dd hh:mm).
- **Run progress** (progresso do ensaio) — O estado atual do ensaio. A dimensão da barra de progresso não é proporcional à taxa do ensaio de cada passo.
- **Q-Score** (pontuações Q) — Apresenta a distribuição das pontuações de qualidade (pontuações Q).
- **Intensity** (intensidade) — Apresenta o valor das intensidades dos clusters do 90^o percentil para cada bloco. As cores no traçado indicam os canais vermelho e verde.
- **Clusters Passing Filter (%)** (clusters que passam pelo filtro) — Apresenta a percentagem de clusters que passam pelo filtro.
- **Projected Total Yield (GB)** (produtividade total esperada) — A produtividade esperada para a célula de fluxo do ensaio. Se as métricas por pista forem selecionadas (H), os números mostrados constituem a produtividade atual por pista e atualiza os resultados por ciclo ao longo do ensaio.
- **Q30** — A percentagem das identificações de bases, no ensaio, com um índice de qualidade ≥ 30 .

Ícones de estado

Um ícone de estado na interface NVOS indica o estado do ensaio. Um número no ícone indica o número de condições para um estado.

Quando um estado do ensaio muda, o ícone pisca. Selecione o ícone para ver uma descrição da condição. Selecione **Acknowledge** (confirmar) para apagar a mensagem e **Close** (fechar) para fechar a caixa de diálogo.

Ícone de estado	Nome do estado	Descrição
	Estado OK	O sistema está normal.
	A processar	O sistema está a processar.
	Aviso	Ocorreu uma notificação que exige a atenção. Os avisos não interrompem um ensaio nem exigem uma ação antes de prosseguir.
	Erro	Ocorreu um erro. Os erros exigem uma ação antes de prosseguirem o ensaio.
	Informações	Está disponível uma mensagem não-crítica.

Métricas do ensaio

O software apresenta as métricas de sequenciação produzidas durante o ensaio. As métricas são apresentadas sob a forma de diagramas, gráficos e tabelas com base nos dados gerados pelo RTA3 e gravados nos ficheiros InterOp.

O clustering leva aproximadamente 2 horas, depois começa a sequenciação com o ciclo 1. As métricas são atualizadas à medida que a sequenciação avança. Os clusters que passam pelo filtro, a produtividade e as pontuações de qualidade ficam disponíveis depois do ciclo 26. Antes do ciclo 26, não são preenchidos automaticamente quaisquer valores, sendo designados como não aplicáveis.

Após a sequenciação

As seguintes secções facultam instruções sobre os passos que ocorrem após a sequenciação ter sido concluída.

Lavagem automática pós-ensaio

Quando a sequenciação está concluída, o software inicia uma lavagem automática pós-ensaio que leva aproximadamente 80 minutos. O sistema bombeia 0,24% de hipoclorito de sódio (NaClO) da posição n.º 17 e dilui-o a 0,12%. O NaClO a 0,12% é bombeado para o reagente ExAmp e as posições do banco, através da célula de fluxo e depois para as embalagens de reagente usadas. O modelo de descargas de lavagem do sistema para

evitar a contaminação cruzada.

Quando a lavagem estiver concluída, o sistema é colocado num modo de segurança e o botão Home fica ativo. Deixe os consumíveis no devido lugar até ao ensaio seguinte. Após a lavagem, as unidades de aspiração nos cartuchos SBS e cluster permanecem na posição inferior para impedir a entrada de ar no sistema. As unidades de aspiração no cartucho tampão são levantadas para que as embalagens de reagente usadas possam ser esvaziadas. O tampão de lavagem é então bombeado em todas as linhas para limpar o NaClO e os reagentes do sistema.

NOTA Se ocorrer um erro durante uma lavagem automática pós-ensaio e esta ficar incompleta, é necessária uma lavagem de manutenção.

Desprender a posição n.º 30

O reservatório na posição n.º 30 do cartucho cluster contém formamida. É retirado do cartucho cluster usado e eliminado separadamente.



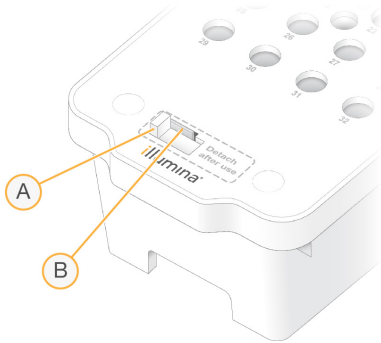
ATENÇÃO

Este conjunto de reagentes contém químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis. Para informações adicionais relativas ao ambiente, saúde e segurança, consulte as fichas SDS em support.illumina.com/sds.html.

1. Com luvas postas empurre o plástico branco do separador rotulado **Detach after use** (Remover após utilização) para a direita.
2. Coloque uma mão ou superfície sólida por baixo do reservatório e prima o separador de plástico transparente em direção à etiqueta Illumina, para libertar o reservatório de debaixo do cartucho cluster.

NOTA Evite empilhar cartuchos cluster ao armazená-los. O empilhamento pode causar o desprendimento accidental do reservatório.

Figura 11 Posição amovível n.º 30



- A. Separador com plástico branco para desprender
- B. Separador com plástico transparente para libertar

3. Elimine o reservatório de acordo com as normas aplicáveis.

Saída de sequenciação

Durante a sequenciação, os dados são transferidos automaticamente de Instrument NovaSeq 6000Dx para Illumina DRAGEN Server. Quando a primeira análise termina e está concluída a transferência de dados, a análise secundária no Illumina DRAGEN Server pode iniciar automaticamente utilizando as opções de análise definidas pela aplicação selecionadas em Illumina Run Manager. Os resultados produzidos dependem das opções efetuadas, durante a preparação do ensaio. Para visualizar os resultados de um ensaio, selecione o nome do ensaio pretendido, no separador Completed no ecrã Runs (Ensaio). Pode também encontrar ficheiros de saída no local especificado no ecrã Instrument Settings (Predefinições do instrumento).

Real-Time Analysis (Análise em tempo real)

O Instrument NovaSeq 6000Dx executa RTA3, uma implementação do software Real-Time Analysis (Análise em tempo real), no instrumento do Compute Engine (CEE). RTA3 extrai as intensidades das imagens recebidas da câmara, efetua identificações de bases, atribui uma pontuação de qualidade às identificações de bases, alinha-se com o PhiX e comunica os dados em ficheiros InterOp.

Para otimizar o tempo de processamento, o RTA3 armazena as informações na memória. Se o RTA3 for terminado, o processamento não é retomado e quaisquer dados do ensaio que estiverem a ser processados na memória são perdidos.

RTA3 Entradas

RTA3 necessita das imagens de blocos contidas na memória do sistema local para o processamento, RTA3 recebe a informação do ensaio e comanda do NVOS.

RTA3 Saídas

As imagens para cada canal colorido são transferidas na memória para o RTA3 como blocos. A partir destas imagens, o RTA3 produz um conjunto de ficheiros de identificação de bases classificados por qualidade e ficheiros de filtro. Todos os outros ficheiros gerados são ficheiros de saída de suporte.

Tipo de ficheiro	Descrição
Ficheiros de identificação de bases	Cada bloco analisado é incluído num ficheiro de identificação de bases concatenado (*.cbcl). Os blocos da mesma via e superfície são agregados em 1 ficheiro CBCL para cada via e superfície.
Ficheiros de filtro	Cada bloco produz um ficheiro de filtro (*.filter) que especifica se um cluster passa pelo filtro.

RTA3 proporciona métricas em tempo real acerca da qualidade do ensaio guardadas como ficheiros InterOp, que são uma saída binária que contém o bloco, ciclo e métricas do nível de leitura.

Tratamento de erros

RTA3 cria ficheiros de registo e grava-os na pasta Logs (Registos). Os erros são registados num ficheiro de texto no formato de ficheiro *.log.

Os seguintes ficheiros de registo são transferidos para o destino de saída final no fim do processamento:

- `info_00000.log` resume os eventos importantes do ensaio.
- `error_00000.log` apresenta os erros que ocorreram durante um ensaio.
- `warning_00000.log` apresenta os avisos que ocorreram durante um ensaio.

Blocos da célula de fluxo

Os blocos são pequenas áreas de imagens na célula de fluxo. A câmara tira uma imagem de cada faixa, que o software divide em blocos para processamento RTA3. O número total de blocos depende do número de pistas, faixas e superfícies cujas imagens são adquiridas na célula de fluxo.

- As células de fluxo S2 têm um total de 1408 blocos.
- As células de fluxo S4 têm um total de 3744 blocos.

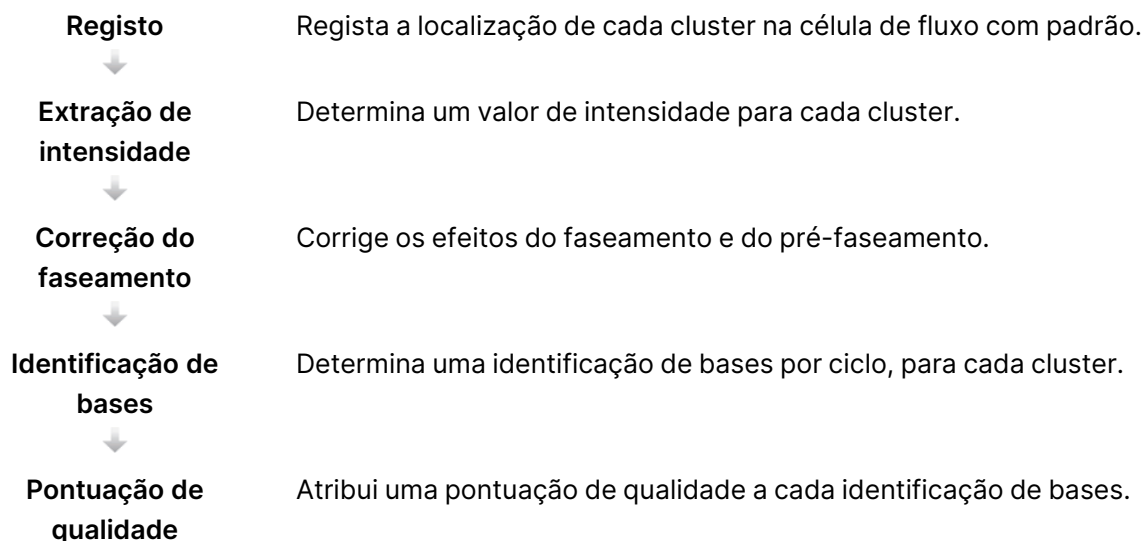
Componente da célula de fluxo	S2	S4	Descrição
Pistas	2	4	Uma pista é um canal físico com portas de entrada e saída.
Superfícies	2	2	São obtidas imagens das células de fluxo S2 e S4 em duas superfícies: a superior e a inferior. Em primeiro lugar, é obtida a imagem da superfície superior de um bloco.

Componente da célula de fluxo	S2	S4	Descrição
Faixas por pista	4	6	Uma faixa é uma coluna numa via da célula de fluxo, que a câmara capta como uma imagem digitalizada.
Blocos por faixa	88	78	Um bloco é uma porção de uma faixa e ilustra uma área capturada em imagem na célula de fluxo.
Total de blocos gerados	1408	3744	As vias × superfícies × faixas × blocos por faixa equivalem ao número total de blocos.

O nome do bloco é um número de cinco dígitos que representa a posição do bloco na célula de fluxo. Por exemplo, o nome do bloco 1_1205 indica a via 1, superfície superior, faixa 2, bloco 5.

- O primeiro dígito corresponde ao número da via:
 - 1 ou 2 para uma célula de fluxo S2.
 - 1, 2, 3 ou 4 para uma célula de fluxo S4.
- O segundo dígito representa a superfície: 1 para superior ou 2 para inferior.
- O terceiro dígito representa o número da faixa:
 - 1, 2, 3 ou 4 para uma célula de fluxo S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 para uma célula de fluxo S4.
- Os últimos dois dígitos representam o número do bloco. A numeração inicia com 01 na extremidade de saída da célula de fluxo até 88 ou 78 na extremidade de entrada.
 - 1 até 88 para uma célula de fluxo S2.
 - 1 até 78 para uma célula de fluxo S4.

Fluxo de trabalho do Real-Time Analysis (Análise em tempo real)



Registo

O registo alinha uma imagem com o conjunto quadrado rodado dos poços nano na célula de fluxo com padrão. Devido à disposição ordenada dos poços nano, as coordenadas X e Y de cada cluster num bloco são predeterminadas. As posições dos clusters são escritas num ficheiro de localização dos clusters (s.locs) para cada ensaio.

Se o registo falhar para quaisquer imagens num ciclo, não são geradas quaisquer identificações de bases para esse bloco nesse ciclo.

Extração de intensidade

Após o registo, a extração de intensidade calcula um valor de intensidade para cada poço nano numa determinada imagem. Se o registo tiver falhado, a intensidade para esse bloco não pode ser extraída.

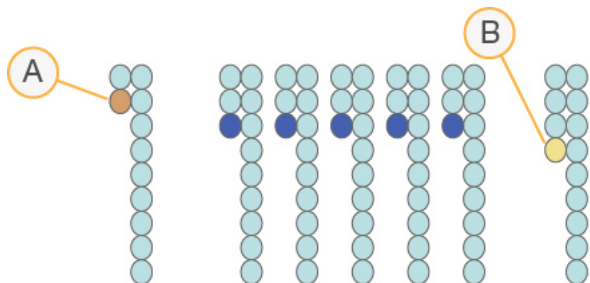
Correção do faseamento

Durante a reação de sequenciação, cada cadeia de ADN num cluster expande-se uma base por ciclo. O faseamento e o pré-faseamento ocorrem quando uma cadeia fica fora de fase com o ciclo atual de incorporação.

O faseamento ocorre quando uma base de incorporação fica para trás.

O pré-faseamento ocorre quando uma base de incorporação avança.

Figura 12 Faseamento e pré-faseamento



- A. Leitura com uma base em faseamento
- B. Leitura com uma base colocada em pré-fase.

O RTA3 corrige os efeitos do faseamento e do pré-faseamento, o que maximiza a qualidade dos dados em cada ciclo do ensaio.

Identificação de bases

A identificação de bases determina a base (A, C, G ou T) de cada cluster de um determinado bloco num ciclo específico. O Instrument NovaSeq 6000Dx utiliza a sequenciação de dois canais, que requer apenas duas imagens para codificar os dados de quatro bases de ADN, uma imagem do canal verde e outra do canal

vermelho.

Uma ausência de identificação é indicada pela letra N. As ausências de identificação ocorrem quando um cluster não passa no filtro, o registo falha ou um cluster é desviado para fora da imagem.

As intensidades de cada cluster são extraídas das imagens vermelha e verde e comparadas umas com as outras, o que resulta em quatro populações distintas. Cada população corresponde a uma base. O processo de identificação de bases determina a que população pertence cada cluster.

Figura 13 Visualização de intensidades de cluster

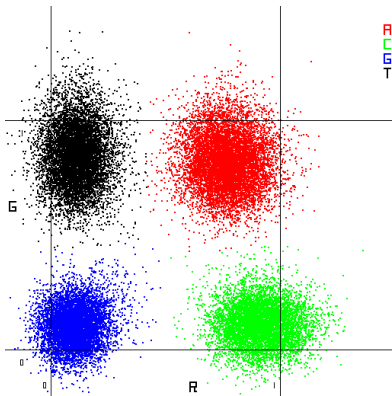


Tabela 8 Identificações de bases na sequenciação de 2 canais

Base	Canal vermelho	Canal verde	Resultado
A	1 (ligado)	1 (ligado)	Clusters que exibem intensidade quer no canal vermelho quer no canal verde.
C	1 (ligado)	0 (desligado)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal vermelho.
G	0 (desligado)	0 (desligado)	Clusters que não exibem qualquer intensidade numa localização conhecida do cluster.
T	0 (desligado)	1 (ligado)	Clusters que exibem intensidade apenas no canal verde.

Clusters que passam pelo filtro

Durante o ensaio, o RTA3 filtra os dados em bruto para remover as leituras que não cumprem o limiar de qualidade dos dados. Os clusters sobrepostos e de baixa qualidade são removidos.

Para a análise de dois canais, o RTA3 utiliza um sistema baseado numa população para determinar a pureza (medição da intensidade de pureza) de uma identificação de bases. O filtro de passagem de clusters (PF) é ativado quando não mais de uma identificação de bases nos primeiros 25 ciclos tiver uma pureza inferior a um limiar fixo. Quando incluído, o alinhamento PhiX é executado no ciclo 26 num subconjunto de blocos dos clusters que passaram no filtro. Os clusters que não passem no filtro não são identificados por bases nem são alinhados.

Pontuações de qualidade

Uma pontuação de qualidade (índice de qualidade) é uma previsão da probabilidade de uma identificação de bases incorreta. Um índice de qualidade mais elevado implica que a identificação de bases tem uma qualidade mais elevada e há mais probabilidade de estar correta. Depois de determinar o índice de qualidade, os resultados são registados nos ficheiros CBCL.

O índice de qualidade comunica sucintamente as probabilidades de pequenos erros. As pontuações de qualidade são representadas como $Q(X)$, onde X é a pontuação. A seguinte tabela mostra a relação entre uma pontuação de qualidade e a probabilidade de erro.

Índice de qualidade - $Q(X)$	Probabilidade de erro
Q40	0,0001 (1 em 10 000)
Q30	0,001 (1 em 1000)
Q20	0,01 (1 em 100)
Q10	0,1 (1 em 10)

Avaliação da qualidade e relatórios

A pontuação de qualidade calcula um conjunto de preditores para cada identificação de bases e, em seguida, usa os valores do preditor para verificar o índice de qualidade numa tabela de qualidade. As tabelas de qualidade são criadas para fornecer previsões de qualidade perfeitamente precisas para ensaios gerados por uma configuração específica da plataforma de sequenciação e versão de química.

A pontuação de qualidade baseia-se numa versão modificada do algoritmo Phred.

Para gerar a tabela de qualidade para o Instrument NovaSeq 6000Dx, três grupos de identificações de bases foram determinados, com base nos clusters destas funcionalidades de previsão específicas. Após o agrupamento destas identificações de bases, a taxa de erro média foi calculada empiricamente para cada um dos três grupos e os índices de qualidade correspondentes foram registados na tabela de qualidade em conjunto com as funcionalidades preditivas correlacionadas com esse grupo. Desta forma, são possíveis apenas três índices de qualidade com o RTA3 e estes índices de qualidade representam a taxa de erro média do grupo. No geral, isto resulta numa avaliação da qualidade simplificada, mas altamente precisa. Os três grupos na tabela de qualidade correspondem às identificações de bases de qualidade marginal ($< Q15$), média ($\sim Q20$) e alta ($> Q30$) e são atribuídos aos índices específicos de 12, 26 e 34 respetivamente. Além disso, um índice nulo de 2 é atribuído a todas as ausências de identificação. Este modelo de relatório sobre os índices de qualidade reduz o espaço de armazenamento e os requisitos de largura de banda sem afetar a exatidão ou o desempenho.

Figura 14 Avaliação da qualidade simplificada com o RTA3




Ficheiros de saída da sequenciação


Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, Localização e Nome
Ficheiros de identificação de bases	Cada cluster analisado está incluído num ficheiro de identificação de bases, agregado num ficheiro por ciclo, via e superfície. O ficheiro agregado contém a identificação de bases e a pontuação de qualidade codificada para cada cluster. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, por exemplo L001_1.cbcl
Ficheiros de localização de clusters	Para cada célula de fluxo, um ficheiro binário de localização de clusters contém as coordenadas XY para os clusters num bloco. Uma disposição hexagonal que corresponde à disposição do poço nano da célula de fluxo predefine as coordenadas. Data\Intensities s_[lane].locs
Ficheiros de filtro	O ficheiro de filtro especifica se um cluster passou pelo filtro. Os ficheiros de filtro são gerados ao ciclo 26 com 25 ciclos de dados. É gerado um ficheiro de filtro para cada bloco. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Ficheiro de informações do ensaio	Indica o nome do ensaio, o número de ciclos em cada leitura, se a leitura é uma leitura de índice e o número de faixas e blocos na célula de fluxo. O ficheiro de informações do ensaio é criado no início do ensaio. [Root folder],RunInfo.xml


Tipo de ficheiro	Descrição de ficheiro, Localização e Nome
Ficheiros de miniatura	Imagens em miniatura para o primeiro ciclo de cada leitura de sequenciação. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] — Os ficheiros são armazenados numa subpasta para cada ciclo. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg — A imagem em miniatura inclui o número do bloco.

Estrutura de pastas de saída de sequenciação

O NVOS gera o nome da pasta de saída automaticamente.

 **Config** — Predefinições de configuração do ensaio.


 **Logs** — Ficheiros de registo que descrevem os passos operacionais, instrumento de análises e RTA3 eventos.

 SampleSheet.csv — Folha de amostra ou outro ficheiro anexado, se aplicável.

 **Data**


 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]** — Ficheiros da identificação de bases (*.cbcl) agregados num ficheiro por pista, superfície e ciclo.

 s.locs — O ficheiro de localização de cluster para o ensaio.

 **InterOp** — Ficheiros binários.

 **Recipe** — Ficheiro de receitas específicas do ensaio.

 **Thumbnail_Images** — Imagens miniatura por cada 10.º bloco.

 **LIMS** — O ficheiro de preparação do ensaio (*.json), se aplicável.

 **Audit**

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SequenceComplete.txt

 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

 Manifest.tsv

Avisos e precauções



ATENÇÃO

A Lei Federal limita este dispositivo à venda por prescrição médica ou prescrição por outro profissional habilitado para exercer de acordo com a legislação do Estado onde exerce, para utilizar ou prescrever a utilização deste dispositivo.

- **Alguns componentes dos reagentes fornecidos pela Illumina para utilização com o Instrument NovaSeq 6000Dx contêm químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer lesões pessoais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis.** Para obter informações adicionais ambientais, de segurança e de saúde, consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS) em support.illumina.com/sds.html.
- O não seguimento dos procedimentos da forma descrita pode resultar em resultados erróneos ou na redução significativa da qualidade das amostras.
- Aplique as precauções de rotina do laboratório. Não coloque a pipeta na boca. Não coma, beba ou fume nas áreas designadas para trabalho. Use luvas descartáveis e batas de laboratório quando manusear espécimes e kits de reagentes. Lave bem as mãos depois de manusear espécimes e kits de reagentes.
- É necessário que sejam implementadas as devidas práticas laboratoriais e as boas práticas de higiene laboratorial para evitar que os produtos PCR contaminem reagentes, instrumentos e amostras genómicas de ADN. A contaminação PCR pode causar resultados imprecisos e não fiáveis.
- Para prevenir a contaminação, certifique-se de que as áreas de pré e pós-amplificação têm equipamento e consumíveis dedicados (p. ex., pipetas, pontas de pipeta, blocos de aquecimento, agitadores por vórtice e centrífugadora).
- O emparelhamento dos índices com as amostras tem de corresponder exatamente à disposição do índice das placas. A DNA Prep with Enrichment Application preenche automaticamente os primers de indexação associados aos nomes das amostras, quando introduzidas durante a preparação do ensaio. Recomenda-se que o utilizador confirme se os primers de indexação são associados às amostras antes de iniciar o ensaio de sequenciação. As divergências entre a amostra e a disposição das placas resulta na perda da identificação positiva da amostra e em relatórios com resultados incorretos.
- Instalação Recomenda-se vivamente ao utilizador a instalação de software antivírus para proteger o computador contra vírus.
- Não utilize o NovaSeq 6000Dx se algum dos painéis for removido. A utilização do instrumento com qualquer um dos painéis removidos cria uma potencial exposição à tensão de linha e a tensões de CC.
- Não toque na plataforma da célula de fluxo no compartimento da mesma. O aquecedor neste compartimento funciona entre os 22 °C e os 95 °C e pode causar queimaduras.
- O instrumento pesa cerca de 480,35 kg (1059 lb) e pode causar ferimentos graves caso se deixe cair ou caso seja utilizado incorretamente.

Caraterísticas de desempenho

Foram estabelecidas características de desempenho para o instrumento NovaSeq 6000Dx, utilizando o Illumina DNA Prep With Enrichment Dx para preparação do banco, o Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) para sequenciação e a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx para análises secundárias, incluindo a detecção da linha germinal e da variante somática. Os estudos incluíram indexação de amostras, contaminação cruzada de amostras, entrada de ADN, sensibilidade analítica (limite de vazão/limite de detecção), precisão, exatidão, comparação de métodos e reprodutibilidade. Consulte o *Folheto informativo do Illumina DNA Prep With Enrichment Dx* para conhecer as características de desempenho relacionadas com fatores pré-clínicos, tais como métodos de extração ou substâncias interferentes.

Definições dos cálculos utilizados nas características de desempenho

1. A PPA (percentagem de concordância positiva) é calculada como a proporção de loci classificados como variantes por um método de referência reportados corretamente pelo ensaio.
 - $(N.^{\circ} \text{ de loci variantes corretamente reportadas pelo ensaio}) / (n.^{\circ} \text{ total de loci variantes})$
As loci variantes reportadas pelo ensaio que são concordantes com o método de referência são verdadeiros positivos (TP). Os loci variantes reportados como identificações de referência ou como identificações de variantes diferentes pelo ensaio são falsos negativos (false negatives, FNs).
2. A NPA (percentagem de concordância negativa) é calculada como a proporção de loci, classificados como tipo selvagem, por um método de referência reportados corretamente pelo ensaio.
 - $(N.^{\circ} \text{ de loci de tipo selvagem corretamente reportados pelo ensaio}) / (n.^{\circ} \text{ total de loci de tipo selvagem})$
Os loci de tipo selvagem reportados pelo ensaio, que são concordantes com o método de referência, são verdadeiros negativos (TN). Os loci de tipo selvagem reportados como variantes pelo ensaio são falsos positivos (FPs).
3. A OPA (percentagem de concordância geral) é calculada como a proporção de loci corretamente pelo ensaio relativo a um método de referência.
 - $([N.^{\circ} \text{ de loci variantes corretamente reportadas pelo ensaio}] + [n.^{\circ} \text{ de loci de tipo selvagem corretamente reportados pelo ensaio}]) / ([n.^{\circ} \text{ total de loci variantes}] + [n.^{\circ} \text{ total de loci de tipo selvagem}])$
4. Os cálculos de PPA, NPA e OPA não incluem quaisquer identificações (loci variante ou de referência que não cumpram um ou mais filtros de qualidade).
5. A percentagem de identificações positivas (PPC) corresponde ao número de observações, em que a variante detetada é dividida pelo número total de observações testado, com exclusão das observações nulas ou das filtradas como de baixa profundidade.

6. A percentagem de identificações negativas (PNC) é calculada como número de observações, com referência de passagem como o resultado de uma posição dividida pelo número total de observações testado, com exclusão das observações nulas ou das filtradas como de baixa profundidade.
7. A percentagem de mobilidade autossómica é calculada como a percentagem de posições de referência não-N nas regiões visadas em cromossomas autossómicos, com uma identificação de passagem do genótipo.

Indexação de amostras

Os primers de indexação de amostras, adicionados durante a preparação de bibliotecas, atribuem uma sequência única a cada amostra de ADN. Estas sequências únicas permitem o pool de várias amostras em conjunto num só ensaio de sequenciação. A indexação de amostras é utilizada em fluxos de trabalho somáticos e de linha germinal. A finalidade deste estudo é estabelecer os números mínimo (12) e máximo (192) de amostras que podem ser processadas num único ensaio de sequenciação pelo Instrument NovaSeq 6000Dx. Foram testadas doze amostras únicas de ADN Platinum Genome (NA12877–NA12888) com, pelo menos, 12 combinações diferentes do primer de indexação por amostra. Foram preparados bancos de amostras utilizando um ensaio representativo concebido para examinar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases nos 23 cromossomas humanos. Os resultados das amostras de quatro ensaios de sequenciação utilizando o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foram comparados com o Platinum Genome versão 2016-1.0.

No primeiro conjunto de ensaios, foram sequenciados 192 bancos de amostras exclusivamente indexados em dois ensaios de sequenciação, cada um com reagentes S2 e S4, para verificar a capacidade do número de índices suportado e a capacidade ensaio de fazer uma identificação de genotipagem consistentemente, numa determinada amostra, em combinações diferentes do primer de indexação. No segundo conjunto de ensaios, foram sequenciados 12 bancos de amostras exclusivamente indexadas em dois ensaios de sequenciação, cada um com reagentes S2 e S4, para verificar a capacidade mínima do número de índices suportado.

Para ensaios com um índice de 192, o PPA para SNV teve um intervalo de 99,7% a 100%, o PPA no caso das inserções era de 100% e das eliminações de 96,7% a 100% e o NPA era de 100%. Para ensaios com um índice de 12, o PPA para SNV teve um intervalo de 99,7% a 100%, o PPA no caso das inserções teve um intervalo de 89,6% a 100% e das eliminações de 94,6% a 100% e o NPA era de 100%.

Contaminação cruzada de amostras

O Instrument NovaSeq 6000Dx permite a sequenciação de amostras múltiplas e controlos num único ensaio de sequenciação. Foi conduzido um estudo para avaliar a extensão da contaminação cruzada de amostras, dentro de um ensaio de sequenciação (dentro do ensaio) e entre ensaios de sequenciação (entre ensaios). Foram analisadas doze amostras de ADN Platinum Genome, seis masculina e seis femininas, com um ensaio representativo concebido para examinar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases nos 23 cromossomas humanos, incluindo ambos os cromossomas sexuais. Os bancos foram sequenciados no Instrument NovaSeq 6000Dx, utilizando o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da

aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Foi observada a contaminação cruzada de amostras masculinas para amostras femininas através da presença de leituras do cromossoma-alvo Y em amostras femininas.

A contaminação cruzada no ensaio pode ter sido introduzida durante a produção de clusters, identificação de bases por ciclo de índice e demultiplexação de amostras. Para testar a contaminação cruzada de amostras num ensaio de sequenciação, foi sequenciado um pool de bancos composto por, pelo menos, doze réplicas de cada amostra masculina e feminina, mais dois controlos sem modelo, para um total de 192 bancos únicos indexados, no Instrument NovaSeq 6000Dx, em dois ensaios de sequenciação, cada um com reagentes S2 e S4. Foi avaliada a contaminação cruzada de amostras no mesmo ensaio comparando a cobertura do cromossoma-alvo Y de cada réplica feminina, com a média da cobertura do cromossoma-alvo Y de todas as réplicas masculinas no pool. O percentil 95 de contaminação cruzada no ensaio observado foi de 0,0090% e de 0,041% para reagentes S2 e S4, respetivamente.

Para testar a contaminação cruzada de amostras de ensaio para ensaio, foram preparados e sequenciados consecutivamente dois pools de bancos num Instrument NovaSeq 6000Dx, com o lado A a utilizar reagentes S4 e o lado B a utilizar reagentes S2. O primeiro pool de bancos era composto por, pelo menos, doze réplicas de seis amostras únicas femininas, mais dois controlos sem modelo, para um total de 96 bancos únicos indexados. O segundo pool de bancos era composto por, pelo menos, doze réplicas de seis amostras únicas masculinas, mais dois controlos sem modelo, para um total de 96 bancos únicos indexados. Ambos pools utilizaram o mesmo conjunto de adaptadores de índice. O pool feminino foi sequenciado, seguindo-se um ensaio de sequenciação posterior com o pool masculino, seguido de outra repetição do ensaio de sequenciação do pool feminino. Foi avaliada a contaminação cruzada de amostras de ensaio para ensaio, por tipo de reagente, S2 e S4 através da comparação da cobertura do cromossoma-alvo Y entre as réplicas correspondentes do ensaio de repetição do pool feminino e do ensaio do pool masculino. O percentil 95 de contaminação cruzada no ensaio-para-ensaio observado foi de 0,0089% e de 0,012% para reagentes S2 e S4, respetivamente.

Entrada de ADN

Sangue (linha germinal)

O intervalo de entrada de ADN sanguíneo para o kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx utilizando a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foi estabelecido para o NovaSeq 6000Dx. Isto foi avaliado executando um estudo de diluição de série com oito amostras de ADN Platinum Genome (NA12877 – NA12884) com um ensaio representativo concebido para examinar uma variedade de genes, abrangendo 1 970 505 bases em todos os 23 cromossomas humanos. Os bancos foram sequenciados num Instrument NovaSeq 6000Dx utilizando um lote cada Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

Foram testadas sete amostras duplicadas a seis níveis de entrada de ADN, com intervalo entre 1000 ng e 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng e 10 ng). Foi testada uma oitava amostra (NA12884) numa única replicação em entrada de 10 ng e em duplicado para todos os outros níveis de entrada. Para determinação da precisão, as amostras de genótipos foram comparadas a Platinum Genomes versão 2016-1.0. Foram determinados resultados para cada nível de entrada. O PPA para cada tipo de variante (SNV, inserções e

eliminações) é apresentado nos [Resultados da PPA para cada entrada de ADN sanguíneo por tipo de variante na página 34](#). O NPA é apresentado no [NPA para cada entrada de ADN sanguíneo na página 34](#). Todos os níveis de entrada tiveram uma precisão similar. A entrada de ADN sanguíneo recomendada para o Illumina DNA Prep With Enrichment Dx é de 50–1000 ng com 1000 ng e 10 ng, a proporcionarem um limite superior e inferior para respeitar as características, quando sequenciada no NovaSeq 6000Dx.

Tabela 9 Resultados da PPA para cada entrada de ADN sanguíneo por tipo de variante

Entrada de ADN (ng)	Tipo de variante	Variantes esperadas	TP	FN	Não identificação de variantes	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	Inserção	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	Eliminação	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	>99,9	
250		2201	0	39	100	
1000		2195	2	43	99,9	

Tabela 10 NPA para cada entrada de ADN sanguíneo

Entrada de ADN (ng)	TN	FP	Não identificação de referências	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 (somático)

O intervalo de entrada de ADN fixado em formalina e incorporado em parafina para o kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx utilizando a aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx foi estabelecido para a NovaSeq 6000Dx. Este intervalo foi avaliado executando um estudo de diluição de série com duas amostras Platinum Genome, com um ensaio representativo concebido, para examinar uma variedade de genes, abrangendo 1 970 505 bases, nos 23 cromossomas humanos. Os bancos foram sequenciados num Instrument NovaSeq 6000Dx utilizando um lote cada Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

A amostra de ADN GM12877 foi diluída na amostra de ADN GM12878 para criar GM12877-13, com variantes heterozigóticas e homozigóticas GM12877 com frequências perto de 6,5% e 13%, respetivamente. A amostra GM12877 não diluída foi igualmente testada. A amostra GM12877-13 foi testada em duplicado a quatro níveis de entrada de ADN, com intervalo entre 1000 ng e 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng e 25 ng). A GM12877 foi testada numa única replicação a 250 ng e em duplicado para todos os outros níveis de entrada. Para determinação da precisão, foram comparadas as identificações de amostras de variantes a Platinum Genomes versão 2016-1.0. Foram determinados resultados para cada nível de entrada. O PPA para cada tipo de variante (SNV, inserções e eliminações) é apresentado nos [Resultados da PPA para cada entrada de ADN por tipo de variante e VAF-alvo na página 35](#). O NPA é apresentado no [NPA para cada entrada de ADN FFPE na página 36](#). Todos os níveis de entrada tiveram uma precisão similar. Para amostras FFPE com valor ΔCq de ≤ 5 , a entrada de ADN sanguíneo recomendada, para o kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx, é de 50–1000 ng com 1000 ng e 25 ng a proporcionarem um limite superior e inferior para respeitar as características de desempenho, quando sequenciadas no NovaSeq 6000Dx.

Tabela 11 Resultados da PPA para cada entrada de ADN por tipo de variante e VAF-alvo

Entrada de ADN (ng)	Tipo de variante	Variantes esperadas	VAF-alvo de diluição								
			0,065				0,13				
			TP	FN	Não identificação de variantes	PPA (%)	Variantes esperadas	TP	FN	Não identificação de variantes	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	Inserção	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	Eliminação	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

Tabela 12 NPA para cada entrada de ADN FFPE

Entrada de ADN (ng)	Tipo selvagem esperado	TN	FP	Não identificação de referências	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

Sensibilidade analítica (Limite de vazio [LoB] e Limite de deteção [LoD])

Este estudo foi realizado para avaliar o limite de vazio (Limit of Blank, LoB) e o limite de deteção (Limit of Detection, LoD) do Somatic FASTQ e do fluxo de trabalho do VCF para a produção de análises, na aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no Instrument NovaSeq 6000Dx. O estudo foi realizado utilizando um ensaio representativo concebido para examinar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases nos 23 cromossomas humanos. As linhas de células GM12878 e GM12877 do Platinum Genome foram fixadas em formalina e incorporadas em parafina, seguindo-se a extração de ADN. Foram preparadas as diluições GM12877 em GM12878, para preparar amostras com 0%, 4%, 6,5% e 13% GM12877 por volume, de modo que as frequências de variantes de 489 variantes exclusivas do GM12877 (454 SNV, 17 inserções e 18 eliminações) estivessem no intervalo de 0 e 0,13. Os bancos de amostras foram preparados utilizando dois lotes de reagentes do kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx e sequenciadas em mais de seis dias de início consecutivos com dois Instrument NovaSeq 6000Dx e dois lotes de cada Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos), para um total de doze ensaios de sequenciação. Isto resultou em 288 observações para cada variante, em cada amostra de diluições. O LoB e o LoD foram calculados utilizando a abordagem clássica indicada em CLSI EP17-A2. O LoB e o LoD foram calculados para reagentes S2 e S4, em separado por pool das frequências de uma variante de todas as variantes no ensaio de sequenciação, para cada tipo de reagente. O erro de tipo I foi definido como 0,01 e o erro de tipo II foi definido como 0,05.

O LoB foi avaliado independentemente por 489 loci, em dois lotes de sequenciação para cada tipo de reagente (S2 ou S4) e preparação de banco. Nos reagentes S2, o percentil 95 LoB foi 2,9%. Nos reagentes S4, o percentil 95 LoB foi 2,2%.

O LoD foi calculado com sucesso para 478 de 489 variantes no S2 e para 485 de 489 variantes no S4. As variantes, em que não foi determinado qualquer LoD, numa ou ambas preparações de bancos, foram excluídas do LoD final atribuído ao sistema NovaSeq 6000Dx. O LoD do sistema NovaSeq 6000Dx, com reagentes S2 e S4, foi determinado utilizando o 95.º percentil dos LoD de variante individual. Nos reagentes S2, o 95.º percentil em 478 variantes de LoD foi 4,8%. Nos reagentes S4, o 95.º percentil em 485 variantes de LoD foi 3,9%.

Precisão

Linha germinal

O seguinte estudo foi desenvolvido para avaliar a precisão da identificação do fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na Instrument NovaSeq 6000Dx utilizando o Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos). Foram testadas quatro amostras exclusivas Platinum Genome de ADN através de um ensaio representativo concebido para analisar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases (9232 alvos) nos 23 cromossomas humanos. Cada uma das amostras foi testada em réplicas de 12, exceto a NA12880 não diluída, que foi testada com 11 réplicas. As 18 amostras de ADN foram testadas por três instrumentos de sequenciação, três lotes de reagentes S2 e dois operadores, em seis dias de início. Foi determinada a precisão para SNV, inserções e eliminações comparando os resultados no Platinum Genome versão 2016-1.0.

Tabela 13 Resumo de concordância da linha germinal

Critérios	Observações totais ¹	Resultados das observações ²	Resultado por ensaio ³
PPA para o SNV	846	99,8	99,9
PPA para inserções	846	97,9	>99,9
PPA para eliminações	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹Calculado como número de amostras por ensaio (47) x números de ensaios (18) = 846.

²Valor mais baixo observado por réplica de amostra, em todos os 18 ensaios.

³Valor mais baixo, quando são analisados dados de cada ensaio, no total.

Concordância da linha germinal por amostra na página 38 contém os dados do estudo apresentados com uma percentagem de concordância positiva e negativa por amostra, em que os resultados da variante são comparados ao Platinum Genomes versão 2016-1.0 para cálculos de PPA. Os três tipos de variantes (SNV, inserções e eliminações) são combinados. Uma vez que o método de referência só fornece resultados para as variantes de nucleótido único e inserções/eliminações, os resultados de base não-variante são comparados ao conjunto hg19 de sequenciação de referência do genoma humano para cálculos de NPA.

Tabela 14 Concordância da linha germinal por amostra

Amostra	Mobilidade do autossoma	Variante esperadas ¹	TP	FN	Não identificação de variantes	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ O número total de variantes em todas as amostras replicadas nos 18 ensaios.

Concordância da linha germinal por amostra e por tipo de variante na página 38 contém os dados do estudo apresentados por amostra, em que os resultados das variantes são comparados com o método de referência composto e bem caracterizado. A detecção é avaliada para cada tipo de variante — SNV, inserções e eliminações — separadamente. As posições de referência são excluídas.

Tabela 15 Concordância da linha germinal por amostra e por tipo de variante

Amostra	SNV			Inserções			Eliminações		
	Esperada	TP	FN	Esperada	TP	FN	Esperada	TP	FN
NA12877	255096	254877	219	10368	10367	1	8208	8208	0
NA12878	250344	250077	221	8424	8424	0	6912	6707	13
NA12879	246024	246024	0	8856	8856	0	6912	6912	0
NA12880	229482	229086	396	9306	9306	0	7326	7159	3

As amostras foram analisadas novamente para identificar pequenas inserções e eliminações (indels). Apresenta-se um resumo geral no *Resumo da detecção de indels da linha germinal na página 38*. Foram identificados 210 indels no total com tamanho entre 1–18 bp no caso das inserções, e 1–21 bp no caso das eliminações.

Tabela 16 Resumo da detecção de indels da linha germinal

Tipo de variante	Variante esperadas	TP	FN	Não identificação de variantes	PPA
Inserção	36954	36953	1	0	>99,9
Eliminação	29358	28986	16	356	99,9

O ensaio representativo era composto por 9232 alvos abrangendo uma variedade de conteúdo genómico. O conteúdo GC dos alvos variou entre 0,20–0,86. Os alvos também tinham uma gama de nucleótido único (p. ex. PolyA, PolyT), repetições de dinucleótidos e trinucleótidos. Os dados compilados por bases de cromossomas, para determinar o efeito do conteúdo genómico na percentagem de identificações corretas, são apresentados em [Precisão ao nível de cromossomas da linha germinal na página 39](#). A percentagem de identificações corretas consiste em identificações de referência e variantes e é inferior a 100% se ocorrerem identificações incorretas ou não identificações.

Tabela 17 Precisão ao nível de cromossomas da linha germinal

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserções (18), Eliminações (4)	[0,22 - 0,8]; Mediana: 0,51	114888718	34	966860	>99,9	0,83
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserções (5), Eliminações (2)	[0,24 - 0,81]; Mediana: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucleótido (12), Trinucleótido (6), Inserções (11), Eliminações (1)	[0,25 - 0,86]; Mediana: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly2 C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucleótido (5), Trinucleótido (5), Inserções (2), Eliminações (2)	[0,27 - 0,77]; Mediana: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleótido (10), Trinucleótido (8), Inserções (8), Eliminações (18)	[0,29 - 0,79]; Mediana: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucleótido (18), Trinucleótido (11), Inserções (4), Eliminações (2)	[0,24 - 0,79]; Mediana: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleótido (31), Trinucleótido (5), Inserções (1), Eliminações (4)	[0,2 - 0,77]; Mediana: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (9), Inserções (4), Eliminações (1)	[0,26 - 0,78]; Mediana: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucleótido (9), Trinucleótido (9), Inserções (4), Eliminações (1)	[0,27 - 0,83]; Mediana: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucleótido (16), Trinucleótido (6), Inserções (1), Eliminações (1)	[0,23 - 0,78]; Mediana: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleótido (26), Trinucleótido (7), Inserções (2), Eliminações (2)	[0,28 - 0,8]; Mediana: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucleótido (7), Trinucleótido (7), Inserções (1), Eliminações (5)	[0,26 - 0,77]; Mediana: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleótido (6), Trinucleótido (8), Inserções (14), Eliminações (0)	[0,28 - 0,79]; Mediana: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly6 C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucleótido (1), Trinucleótido (6), Inserções (4), Eliminações (1)	[0,29 - 0,77]; Mediana: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucleótido (8), Inserções (4), Eliminações (6)	[0,29 - 0,76]; Mediana: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (10), Inserções (15), Eliminações (21)	[0,3 - 0,76]; Mediana: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
cromossoma 17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucleótido (13), Trinucleótido (6), Inserções (18), Eliminações (16)	[0,28 - 0,82]; Mediana: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34
cromossoma 18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucleótido (10), Inserções (4), Eliminações (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26
cromossoma 19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (7), Inserções (2), Eliminações (21)	[0,33 - 0,83]; Mediana: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79
cromossoma 20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucleótido (9), Inserções (5), Eliminações (0)	[0,31 - 0,84]; Mediana: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
cromossoma 21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucleótido (5), Inserções (2), Eliminações (5)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23
cromossoma 22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (6), Inserções (6), Eliminações (0)	[0,27 - 0,74]; Mediana: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
cromossoma X	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucleótido (5), Trinucleótido (23), Inserções (3), Eliminações (0)	[0,2 - 0,72]; Mediana: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
cromossoma Y	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Inserções (0), Eliminações (0)	[0,4 - 0,59]; Mediana: 0,45	0	0	0	N/D	N/D

Os resultados de sequenciação da amostra NA12878 foram comparados a um genótipo com um nível de confiança muito elevado para NA12878 e estabelecido pelo NIST (National Institute of Standards and Technology – Instituto Nacional de Normas e Tecnologia) (v.2.19). Dos 9.232 alvos, 8.009 foram totalmente incluídos em regiões genómicas com um nível de confiança muito elevado, 776 tinham sobreposição parcial e 447 não tinham sobreposição na sequência do NIST. Isto resultou em 1 831 483 coordenadas por réplica para comparação. Foram comparadas identificações de base não-variantes com o genoma humano de referência do conjunto hg19. Os resultados de precisão são mostrados na [Concordância da linha germinal da amostra NA12878 com a base de dados do NIST na página 43](#).

Tabela 18 Concordância da linha germinal da amostra NA12878 com a base de dados do NIST

Amostra	N.º de alvos abrangidos	Mobilidade do autossoma	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Com base nos dados fornecidos por este estudo de linha germinal de 18 ensaios, o Instrument NovaSeq 6000Dx pode sequenciar de forma consistente:

- Conteúdo GC \geq 20% (todas as bases identificadas em 1692 regiões-alvo sequenciadas com 20% de conteúdo GC identificado corretamente com uma taxa de não identificação de 0%)
- Conteúdo GC \leq 86% (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas com 86% de conteúdo GC identificado corretamente com uma taxa de não identificação de 0%)
- Tamanhos PolyA \leq 46 (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas contendo uma repetição de 46 PolyA identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 0,27%)

- Tamanhos PolyT ≤ 40 (13 384 074 de 13 384 321 bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, contendo uma repetição de 40 PolyT identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 0,26%)
- Tamanhos PolyG ≤ 11 (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas contendo uma repetição de 11 PolyG identificados corretamente, com uma taxa de não identificação de 0%)
- Tamanhos PolyC ≤ 8 (9 815 030 de 9 815 035 bases identificadas em 5922 regiões-alvo sequenciadas, contendo uma repetição de 8 PolyC identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 0,53%)
- Tamanhos de repetição de dinucleótidos $\leq 31x$ (32 233 922 de 32 233 926 bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com uma repetição de 31 dinucleótidos identificados corretamente com uma taxa de não-identificação de 0,21%)
- Tamanhos de repetição de trinucleótidos $\leq 23x$ (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com uma repetição de 23 trinucleótidos identificados corretamente com uma taxa de não-identificação de 0,21%)
- Tamanhos da inserção ≤ 18 (todas as bases identificadas em 1692 regiões-alvo sequenciadas, com 18 inserções identificadas corretamente com uma taxa de não identificação de 7,71%)
- Tamanhos da eliminação ≤ 21 (as bases identificadas em 1692 regiões-alvo sequenciadas, com 21 eliminações identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 1,14%)

Somático

O estudo aqui descrito foi utilizado para avaliar a precisão da identificação do fluxo de trabalho de produção de análises do Somatic Variant, na aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na Instrument NovaSeq 6000Dx utilizando o Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos).

Este estudo utilizou um ensaio representativo concebido para analisar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases (9232 alvos) em todos os 23 cromossomas humanos. O ADN do Platinum Genome foi extraído dos blocos FFPE tratados, para produzir quatro amostras exclusivas para avaliação no estudo.

A amostra de ADN GM12877 foi diluída na amostra de ADN GM12878 para criar GM12877-13, com variantes heterozigóticas e homozigóticas GM12877 com frequências perto de 6,5% e 13%, respetivamente. A amostra de ADN GM12878 foi diluída igualmente na amostra de ADN GM12877 para criar GM12878-13, com variantes heterozigóticas e homozigóticas GM12878 com frequências perto de 6,5% e 13%, respetivamente. As amostras GM12877 e GM12878 não diluídas foram igualmente testadas. Cada uma das amostras foi testada em réplicas de 12, exceto a GM12878 não diluída, que foi testada com onze réplicas. As duas amostras de ADN foram testadas por três instrumentos de sequenciação, três lotes de reagentes S4 e dois operadores, em seis dias de início. Foi determinada a precisão para SNV, inserções e eliminações comparando os resultados no Platinum Genome versão 2016-1.0.

Tabela 19 Resumo da concordância somática

Critérios	N.º de observações ¹	Resultados das observações ²	Resultado por ensaio ³
PPA para SNV somáticos	846	99,8	98,9
PPA para inserções somáticas	846	100	100
PPA para eliminações somáticas	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ Calculado como = N.º de amostras por ensaio (47) x N.º de ensaios (18) = 846.

² Valor mais baixo observado por réplica de amostra em todos os 18 ensaios.

³ Valor mais baixo, quando são analisados dados de cada ensaio, no total.

A [Concordância somática por amostra na página 45](#) contém os dados do estudo apresentados com uma percentagem de concordância positiva e negativa por amostra, em que os resultados da variante são comparados ao método de referência composto e bem caracterizado para cálculos de PPA. Os três tipos de variantes (SNV, inserções e eliminações) são combinados. Uma vez que o método de referência só fornece resultados para as variantes de nucleótido único e inserções/eliminações, os resultados de base não-variante são comparados ao conjunto hg19 de sequenciação de referência do genoma humano para cálculos de NPA.

Tabela 20 Concordância somática por amostra

Amostra	Mobilidade do autossoma	Variantes esperadas	TP	FN	Não identificação de variantes	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

[Concordância somática por amostra e por tipo de variante na página 46](#) contém os dados do estudo apresentados por amostra, em que os resultados das variantes são comparados com o método de referência composto e bem caracterizado. A deteção é avaliada para cada tipo de variante — SNV, inserções e eliminações — separadamente. As posições de referência são excluídas.

Tabela 21 Concordância somática por amostra e por tipo de variante

Amostra	SNV			Inserções			Eliminações		
	Esperada	TP	FN	Esperada	TP	FN	Esperada	TP	FN
GM12877	89694	88488	198	3564	3564	0	2970	2970	0
GM12878	92664	92390	0	2160	2160	0	1944	1728	0
GM12877-13	97848	95901	216	3888	3888	0	3240	3240	0
GM12878-13	92664	92139	0	2160	2160	0	1944	1728	0

As quatro amostras foram analisadas novamente para identificar pequenas inserções e eliminações (indels). Apresenta-se um resumo geral no [Resumo da detecção de indels somáticos na página 46](#). Foram identificados 210 indels no total com tamanho entre 1–18 bp no caso das inserções, e 1–21 bp no caso das eliminações.

Tabela 22 Resumo da detecção de indels somáticos

Tipo de variante	Variantes esperadas	TP	FN	Não identificação de variantes	PPA
Inserção	11772	11772	0	0	100
Eliminação	10098	9666	0	432	100

O ensaio representativo era composto por 9232 alvos abrangendo uma variedade de conteúdo genómico. O conteúdo GC dos alvos variou entre 0,20–0,86. Os alvos também tinham uma gama de nucleótido único (p. ex. PolyA, PolyT), repetições de dinucleótidos e trinucleótidos. Os dados compilados por bases de cromossomas, para determinar o efeito do conteúdo genómico na percentagem de identificações corretas, são apresentados na [Precisão ao nível somático de cromossomas na página 47](#). A percentagem de identificações corretas consiste em identificações de referência e variantes e é inferior a 100% se ocorrerem identificações incorretas ou não identificações.

Tabela 23 Precisão ao nível somático de cromossomas

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserções (3), Eliminações (0)	[0,22 - 0,8]; Mediana: 0,51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinucleótido (22), Trinucleótido (8), Inserções (5), Eliminações (1)	[0,24 - 0,81]; Mediana: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinucleótido (12), Trinucleótido (6), Inserções (1), Eliminações (1)	[0,25 - 0,86]; Mediana: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinucleótido (5), Trinucleótido (5), Inserções (0), Eliminações (1)	[0,27 - 0,77]; Mediana: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleótido (10), Trinucleótido (8), Inserções (8), Eliminações (18)	[0,29 - 0,79]; Mediana: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinucleótido (18), Trinucleótido (11), Inserções (0), Eliminações (1)	[0,24 - 0,79]; Mediana: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleótido (31), Trinucleótido (5), Inserções (1), Eliminações (4)	[0,2 - 0,77]; Mediana: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (9), Inserções (4), Eliminações (0)	[0,26 - 0,78]; Mediana: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinucleótido (9), Trinucleótido (9), Inserções (0), Eliminações (1)	[0,27 - 0,83]; Mediana: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinucleótido (16), Trinucleótido (6), Inserções (0), Eliminações (0)	[0,23 - 0,78]; Mediana: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinucleótido (26), Trinucleótido (7), Inserções (2), Eliminações (2)	[0,28 - 0,8]; Mediana: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinucleótido (7), Trinucleótido (7), Inserções (0), Eliminações (3)	[0,26 - 0,77]; Mediana: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinucleótido (6), Trinucleótido (8), Inserções (14), Eliminações (0)	[0,28 - 0,79]; Mediana: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly6 C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinucleótido (1), Trinucleótido (6), Inserções (4), Eliminações (0)	[0,29 - 0,77]; Mediana: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinucleótido (8), Inserções (4), Eliminações (0)	[0,29 - 0,76]; Mediana: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (10), Inserções (15), Eliminações (21)	[0,3 - 0,76]; Mediana: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8
cromossoma 17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucleótido (13), Trinucleótido (6), Inserções (18), Eliminações (1)	[0,28 - 0,82]; Mediana: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
cromossoma 18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinucleótido (10), Inserções (0), Eliminações (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2
cromossoma 19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (7), Inserções (2), Eliminações (3)	[0,33 - 0,83]; Mediana: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6
cromossoma 20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinucleótido (9), Inserções (5), Eliminações (0)	[0,31 - 0,84]; Mediana: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6
cromossoma 21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinucleótido (5), Inserções (1), Eliminações (0)	[0,22 - 0,78]; Mediana: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
cromossoma 22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinucleótido (5), Trinucleótido (6), Inserções (6), Eliminações (0)	[0,27 - 0,74]; Mediana: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6
cromossoma X	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinucleótido (5), Trinucleótido (23), Inserções (3), Eliminações (0)	[0,2 - 0,72]; Mediana: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7

Cromossoma	N.º de genes	N.º de alvos	N.º de bases	Conteúdo genómico	Gama GC	Identificações corretas	Identificações incorretas	Não identificações	% de identificações corretas	N.º de não-identificações
cromossoma Y	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Inserções (0), Eliminações (0)	[0,4 - 0,59]; Mediana: 0,45	0	0	0	N/D	N/D

Os resultados de sequenciação da amostra GM12878 foram comparados a um genótipo com um nível de confiança muito elevado para NA12878 e estabelecido pelo NIST (National Institutes of Standards and Technology [Instituto nacional de normas e tecnologia]) (v.2.19). Dos 9.232 alvos, 8.009 foram totalmente incluídos em regiões genómicas com um nível de confiança muito elevado, 776 tinham sobreposição parcial e 447 não tinham sobreposição na sequência do NIST. Isto resultou em 1 831 483 coordenadas por réplica para comparação. Foram comparadas identificações de base não-variantes com o genoma humano de referência do conjunto hg19. Os resultados de precisão são mostrados na [Concordância somática da amostra GM12878 com a base de dados do NIST na página 51](#).

Tabela 24 Concordância somática da amostra GM12878 com a base de dados do NIST

Amostra	N.º de alvos abrangidos	Mobilidade do autossoma	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Com base nos dados fornecidos por este estudo Somatic de 18 ensaios, o Instrument NovaSeq 6000Dx pode sequenciar de forma consistente:

- Conteúdo GC \geq 20% (todas as bases identificadas em 1692 regiões-alvo sequenciadas com 20% de conteúdo GC identificado corretamente com uma taxa de não identificação de 0,34%)
- Conteúdo GC \leq 86% (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas com 86% de conteúdo GC identificado corretamente com uma taxa de não identificação de 4,21%)
- Tamanhos PolyA \leq 46 (14 550 082 de 14 550 083 bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas contendo uma repetição de 46 PolyA identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 4,18%)
- Tamanhos PolyT \leq 40 (12 833 489 de 12 833 491 bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, contendo uma repetição de 40 PolyT identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 4,37%)
- Tamanhos PolyG \leq 11 (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas contendo uma repetição de 11 PolyG identificados corretamente, com uma taxa de não identificação de 7,59%)
- Tamanhos PolyC \leq 8 (9 405 604 de 9 405 615 bases identificadas em 5922 regiões-alvo sequenciadas, contendo uma repetição de 8 PolyC identificados corretamente com uma taxa de não identificação de 4,68%)

- Tamanhos de repetição de dinucleótidos $\leq 31x$ (30 996 684 de 30 996 712 bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com uma repetição de 31 dinucleótidos identificados corretamente com uma taxa de não-identificação de 4,04%)
- Tamanhos de repetição de trinucleótidos $\leq 23x$ (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com uma repetição de 23 trinucleótidos identificados corretamente com uma taxa de não-identificação de 5,39%)
- Tamanhos da inserção ≤ 18 (todas as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com 18 inserções identificadas corretamente com uma taxa de não identificação de 1,44%)
- Tamanhos da eliminação ≤ 21 (as bases identificadas em 846 regiões-alvo sequenciadas, com 21 eliminações identificadas corretamente com uma taxa de não identificação de 7,86%)

Precisão

A precisão do Instrument NovaSeq 6000Dx foi avaliada utilizando amostras do Platinum Genome com um ensaio representativo concebido para analisar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases em 23 cromossomas diferentes, utilizando 9.232 oligonucleótidos-alvo. Foi avaliado um total de 1723 pequenas variantes visadas (SNV, inserções e eliminações). A realização de testes em linhas germinais consistiu em onze ou doze replicações de quatro amostras únicas Platinum Genome. A realização de testes somáticos consistiu em onze ou doze replicações de quatro amostras únicas Platinum Genome tratadas com FFPE a vários níveis VAF. Foram preparados bancos de amostras com o kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx de reagentes.

Foram realizados testes num centro próprio, utilizando três Instrument NovaSeq 6000Dx, três lotes cada de Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e dois operadores durante seis dias de início. Em cada dia de início, os bancos de amostras da linha germinal foram sequenciados num instrumento secundário, utilizando os reagentes S2 e o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, tendo os bancos de amostras somáticas sido sequenciados noutro instrumento secundário utilizando reagentes S4 e o fluxo de trabalho Somatic FASTQ e a produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Estes testes resultaram em 18 células de fluxo, para cada um dos fluxos de trabalho somático e da linha germinal.

Linha germinal

Nos ensaios da linha germinal, as localizações genómicas, onde a variante da linha germinal visada é detetada, são registados como positivos (variante). No caso das variantes positivas da linha germinal, os dados foram avaliados em relação à taxa de não identificação e à percentagem de identificação positiva (PPC) em cada tipo de variante (SNV, inserção, eliminação). [Observações de precisão interna de laboratório de identificações na linha germinal para resultados positivos esperados por tipo de variante na página 53](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 25 Observações de precisão interna de laboratório de identificações na linha germinal para resultados positivos esperados por tipo de variante

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações positivas ²	Total de identificações avaliáveis	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Inserção	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Eliminação	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações positivas definidas como posições cromossómicas visadas, em que é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

As localizações genómicas, onde a variante da linha germinal visada não é detetada, são registadas como negativas (tipo selvagem). No caso das localizações negativas esperadas, os dados foram avaliados em relação a taxas de não-identificação e percentagem negativa de identificações (PNC). [Observações de precisão interna de laboratório de identificações na linha germinal para resultados negativos esperados na página 54](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson.

Tabela 26 Observações de precisão interna de laboratório de identificações na linha germinal para resultados negativos esperados

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações negativas ²	Total de identificações avaliáveis	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Tipo selvagem	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações negativas definidas como posições cromossómicas visadas, em que não é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

A contribuição de cada parâmetro (instrumento, lote de reagentes, dia, replicação do banco) para a variabilidade global foi determinada por análise do desvio de componente, utilizando a variante de frequência como variável de resposta. O desvio-padrão global teve uma média de 0,0370. O fator que mais contribuiu para a variabilidade da variante frequência foi das replicações de preparação de bancos, contribuindo para 17,1% da variabilidade total. O parâmetro dia contribuiu para 1%, enquanto o do instrumento e do lote de reagentes contribuíram para menos de 1% da variabilidade total [Estimativas de precisão interna de laboratório de componentes de desvio em frequências de variante em amostras na linha germinal na página 54](#) (SD = desvio-padrão).

Tabela 27 Estimativas de precisão interna de laboratório de componentes de desvio em frequências de variante em amostras na linha germinal

Componente	Média SD	% média do SD total
Dia	0,0020	1,028
Instrumento	0,0018	0,837
Lote de consumíveis	0,0016	0,712
Replicação do banco	0,0143	17,110
Total	0,0370	100

Somático

Nos ensaios somáticos, as localizações genómicas, onde a variante somática visada é detetada, são registados como positivos (variante). No caso das amostras diluídas GM12877-13 e GM12878-13 com variantes positivas somáticas nos VAF entre 6,5% e 13%, os dados foram avaliados em relação à taxa de não identificação e à percentagem de identificação positiva (PPC) em cada tipo de variante (SNV, inserção, eliminação).

[Observações de precisão interna de laboratório de identificações somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante \(VAF is \$\geq 6.5\%\$ and \$\leq 13\%\$ \) na página 55](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 28 Observações de precisão interna de laboratório de identificações somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante (VAF is $\geq 6.5\%$ and $\leq 13\%$)

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações positivas ²	Total de identificações avaliáveis	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Inserção	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Eliminação	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações positivas definidas como posições cromossómicas visadas, em que é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

As localizações genómicas, onde a variante somática visada não é detetada, são registadas como negativas (tipo selvagem). No caso das localizações negativas esperadas, os dados foram avaliados em relação a taxas de não-identificação e percentagem negativa de identificações. [Observações de precisão interna de laboratório de identificações somáticas para resultados negativos esperados na página 55](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 29 Observações de precisão interna de laboratório de identificações somáticas para resultados negativos esperados

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações negativas ²	Total de identificações avaliáveis	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Tipo selvagem	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações negativas definidas como posições cromossómicas visadas, em que não é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

A contribuição de cada parâmetro (instrumento, lote de reagentes, dia, replicação do banco) para a variabilidade global foi determinada por análise do desvio de componente, utilizando a variante de frequência como variável de resposta. O desvio-padrão global teve uma média de 0,0062. As replicações de preparação de bancos mantiveram-se como a fonte mais significativa de variabilidade, com 50,7% do total. Os parâmetros dia, instrumento e lote de consumível contribuíram para menos de 1% da variabilidade total [Estimativas de precisão interna de laboratório de componentes de desvio em frequências de variante em amostras somáticas na página 56](#) (SD = desvio-padrão).

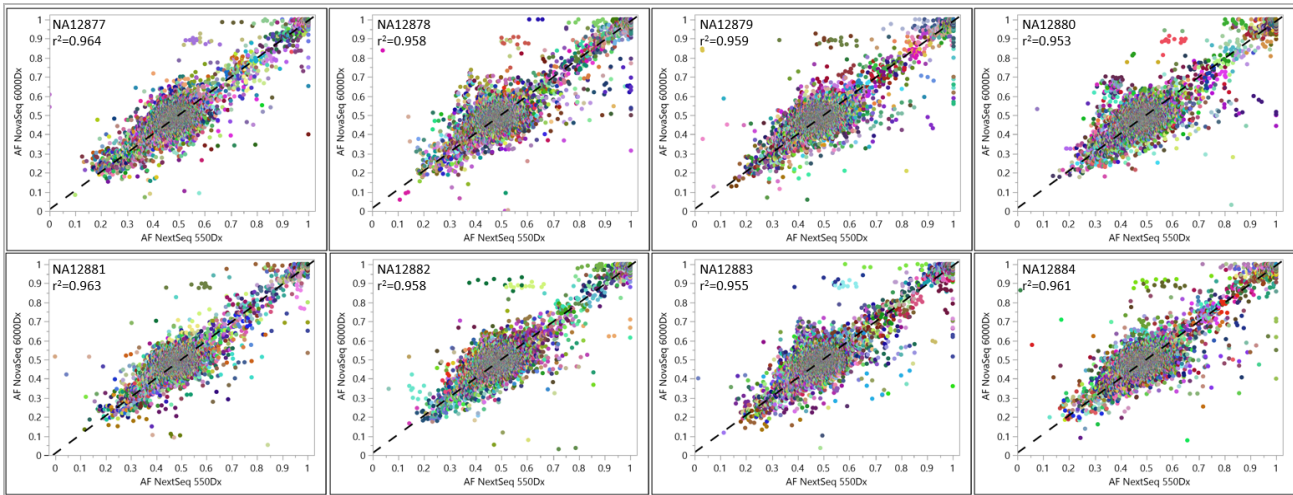
Tabela 30 Estimativas de precisão interna de laboratório de componentes de desvio em frequências de variante em amostras somáticas

Componente	Média SD	% média do SD total
Dia	0,0002	0,41
Instrumento	0,0002	0,40
Lote de consumíveis	0,0002	0,35
Replicação do banco	0,0044	50,7
Total	0,0062	100

Método de comparação

Foi realizado um estudo para comparar o desempenho entre NovaSeq 6000Dx e NextSeq 550Dx Instruments. A concordância da variante de frequência nas amostras de sangue foi avaliada, utilizando um ensaio representativo concebido para examinar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases, nos 23 cromossomos humanos. Foram testadas oito amostras de ADN Platinum Genome, sete em replicação de seis e uma (NA12881) em replicação de cinco. Os bancos foram sequenciados no Instrument NovaSeq 6000Dx, utilizando o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx e na NextSeq 550Dx Instrument utilizando o módulo DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager. [Diagramas de correlação da variante frequência \(os pontos são coloridos por variante exclusiva. As variantes podem ser coloridas de forma diferente em cada diagrama individual.\) na página 57](#) diagramas de correlação do VAF entre os dois instrumentos de cada amostra. Com base na forte correlação entre o instrumento Instrument NovaSeq 6000Dx e o NextSeq 550Dx Instrument, as características de desempenho relacionadas com fatores pré-analíticos (p. ex., métodos de extração ou substâncias interferentes) foram determinadas para serem aplicáveis a ambos os instrumentos. Consulte o folheto informativo do Illumina DNA Prep With Enrichment Dx para obter detalhes adicionais.

Figura 15 Diagramas de correlação da variante frequência (os pontos são coloridos por variante exclusiva. As variantes podem ser coloridas de forma diferente em cada diagrama individual.)



Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do Instrument NovaSeq 6000Dx foi avaliada utilizando amostras do Platinum Genome com um ensaio representativo concebido para analisar uma variedade de genes abrangendo 1 970 505 bases em 23 cromossomas diferentes, utilizando 9232 oligonucleótidos-alvo. Foi avaliado um total de 1723 pequenas variantes visadas (SNV, inserções e eliminações). A realização de testes em linhas germinais consistiu em três ou quatro replicações de doze amostras únicas Platinum. A realização de testes somáticos consistiu em cinco ou seis replicações de oito amostras únicas Platinum Genome tratadas com FFPE a vários níveis VAF. Foram preparados bancos de amostras com o kit Illumina DNA Prep With Enrichment Dx de reagentes.

Os testes foram realizados em três centros clínicos externos utilizando um lote cada de Kit Reagente S2 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos) e Kit Reagente S4 v1.5 NovaSeq 6000Dx (300 ciclos). Foi utilizado um único Instrument NovaSeq 6000Dx em cada centro clínico. A realização de testes foi conduzida por dois operadores em cada centro. Cada operador realizou os testes em três dias de início não consecutivos, para cada tipo de amostra para um total de 36 células de fluxo nos três centros. Em cada dia, os bancos de amostras da linha germinal foram sequenciados em instrumento do lado A, utilizando os reagentes S2 e o fluxo de trabalho Germline FASTQ e a produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, tendo sido sequenciadas no instrumento do lado B utilizando reagentes S4 e o fluxo de trabalho Germline FASTQ e da produção de análises VCF da aplicação DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Estes testes resultaram em 18 células de fluxo, para cada um dos fluxos de trabalho somático e da linha germinal.

Linha germinal

Nos ensaios da linha germinal, as localizações genómicas, onde a variante da linha germinal visada é detetada, são registados como positivos (variante). No caso das variantes positivas da linha germinal, os dados foram avaliados em relação à taxa de não identificação e à percentagem de identificação positiva (PPC) em cada tipo de variante (SNV, inserção, eliminação). [Observações de identificações na linha germinal para resultados](#)

[positivos esperados por tipo de variante na página 58](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 31 Observações de identificações na linha germinal para resultados positivos esperados por tipo de variante

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações positivas ²	Total de identificações avaliáveis	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Inserção	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Eliminação	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações positivas definidas como posições cromossómicas visadas, em que é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

As localizações genómicas, onde a variante da linha germinal visada não é detetada, são registadas como negativas (tipo selvagem). No caso das localizações negativas esperadas, os dados foram avaliados em relação a taxas de não-identificação e percentagem negativa de identificações (PNC). [Observações da identificação na linha germinal para resultados negativos esperados na página 58](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson.

Tabela 32 Observações da identificação na linha germinal para resultados negativos esperados

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações negativas ²	Total de identificações avaliáveis	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Tipo selvagem	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações negativas definidas como posições cromossómicas visadas, em que não é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

Somático

Nos ensaios somáticos, as localizações genómicas, onde a variante somática visada é detetada, são registados como positivos (variante). No caso das variantes positivas somáticas, onde a média da frequência de alelos de variantes (VAF) é superior ou igual a 14% ou inferior ou igual a 28%, os dados foram avaliados em relação à taxa de não-identificação e à percentagem de identificação positiva (PPC), em cada tipo de variante (SNV, inserção, eliminação). [Observações de identificações somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante](#)

(média do VAF $\geq 14\%$ e $\leq 28\%$) na página 59 resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 33 Observações de identificações somáticas para resultados positivos esperados por tipo de variante (média do VAF $\geq 14\%$ e $\leq 28\%$)

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações positivas ²	Total de identificações avaliáveis	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Inserção	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Eliminação	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações positivas definidas como posições cromossómicas visadas, em que é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

As localizações genómicas, onde a variante somática visada não é detetada, são registadas como negativas (tipo selvagem). No caso das localizações negativas esperadas, os dados foram avaliados em relação a taxas de não-identificação e percentagem negativa de identificações. [Observações da identificação somática para resultados negativos esperados na página 59](#) resume os resultados observados, juntamente com níveis de confiança superiores e inferiores de 95% (LCL/UCL) calculados utilizando o método de pontuação de Wilson, para cada tipo de variante.

Tabela 34 Observações da identificação somática para resultados negativos esperados

Tipo de variante	Não foram observadas identificações ¹	Total de identificações	Percentagem de não-identificações	Foram observadas identificações negativas ²	Total de identificações avaliáveis	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Tipo selvagem	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Sem identificações definidas como posição cromossómica visada, em que não pode ser determinada uma variante (devido à baixa profundidade da cobertura).

² Identificações negativas definidas como posições cromossómicas visadas, em que não é detetada uma variante.

³ Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

Histórico de revisões

Documento	Data	Descrição da alteração
Documento n.º 200025276 v01	Setembro de 2022	Dados atualizados de precisão de observações de identificações da linha germinal.
Documento n.º 200025276 v00	Agosto de 2022	Edição inicial.

Patentes e marcas comerciais

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Informações de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Califórnia 92122 EUA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (fora da América do Norte)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Baixos

Promotor australiano

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

Etiquetas do produto

Para uma referência completa de símbolos que constam da embalagem e das etiquetas do produto, consulte a chave de símbolos em support.illumina.com no separador *Documentation* do seu kit.