

Přiložená dokumentace

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO
POUZE PRO EXPORT

Účel použití

Přístroj NovaSeq 6000Dx je určen k sekvenování DNA knihoven s využitím diagnostických testů *in vitro* (IVD). Přístroj NovaSeq 6000Dx je určen k použití se specifickými registrovanými, certifikovanými nebo schválenými IVD reagenty a analytickým softwarem.

Principy postupu

Přístroj NovaSeq 6000Dx společnosti Illumina® je určen pro sekvenování knihoven DNA s diagnostickými rozborů *in vitro*. Jako vstup používá NovaSeq 6000Dx knihovny připravené z DNA, kdy se indexy vzorků a zachycené sekvence připojují k amplifikovaným cílům. Knihovny vzorků se zachytí v průtokové kyvetě a jsou přístrojem sekvenovány pomocí chemikálií pro technologii SBS (Sequencing by synthesis). Technologie SBS využívá metodu reverzibilního terminátoru k detekci fluorescenčně značených jednotlivých nukleotidových bází při jejich začleňování do rostoucích řetězců DNA. Software pro analýzu v reálném čase (RTA) provádí analýzu snímků a přiřazení bází a každé bázi za každý cyklus sekvenování přiřadí kvalitativní skóre. Po dokončení primární analýzy může být provedena sekundární analýza na zahrnutém a požadovaném Server Illumina DRAGEN pro NovaSeq 6000Dx pro zpracování přiřazení bází. V závislosti na pracovním postupu využívá NovaSeq 6000Dx různé aplikace pro sekundární analýzu. U aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahrnuje zpracování demultiplexování, generování souborů FASTQ, zarovnání, přiřazení variant a generování souborů ve formátu přiřazení variant (VCF a gVCF). Soubory VCF a gVCF obsahují informace o germinálních nebo somatických variantách (v závislosti na vybraném pracovním postupu), které se nacházejí na konkrétních pozicích v referenčním genomu.

Duální provozní režim

NovaSeq 6000Dx zahrnuje pevný disk se samostatným diagnostickým režimem *in vitro* (IVD) a režimem pouze pro výzkumné účely (RUO). Režim se vybírá pomocí přepínače na obrazovce Sequencing (Sekvenování). Vybraný režim je jasně označen v rozhraní na všech obrazovkách. Sekvenační testy IVD, včetně aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v germinálních a/nebo somatických pracovních postupech, probíhají v režimu IVD. V režimu IVD lze použít pouze reagenty pro sekvenování IVD. Výkonnostní charakteristiky a omezení postupu pro NovaSeq 6000Dx byly stanoveny pomocí aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v režimu IVD.

Omezení postupu

1. Určeno pouze k diagnostice *in vitro*.
2. Pokud se aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx používá s Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů), je schopna poskytovat:
 - Výstupní data sekvenování:
 - $\geq 1,0$ terabáze (TB) se sadou S2
 - $\geq 3,0$ TB se sadou S4
 - Délka čtení (v běhu se spárovanými konci) 2 x 150 párů bází (bp).
 - Báze vyšší než Q30 ≥ 85 % při délce čtení 2 x 150 bp. Nejméně 85 % přiřazení bází má kvalitativní skóre Phred větší než 30, což znamená, že přesnost přiřazení báze je větší než 99,9 %.
3. Inzerce délky > 18 bp a delece délky > 21 bp nebyly validovány.
4. Velké varianty, včetně vícenukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné menší varianty.
5. Malé MNV jsou ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné varianty.
6. Delece se v souboru VCF vykážou na souřadnici předcházející báze v souladu s formátem VCF. Proto je nutné zvážit přiléhající varianty dříve, než se vykáže, že signál přiřazení individuální báze je homozygotní reference.
7. Specifická omezení týkající se germinálních variant:
 - Přístroj NovaSeq 6000Dx využívající pracovní postup analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky pro přiřazování germinálních variant (např. homozygotní, heterozygotní, divoký typ).
 - Zda bude varianta identifikována jako homozygotní nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
 - Systém nebude hlásit víc než dvě varianty v jednom lokusu, a to ani za přítomnosti variability počtu kopií.
8. Specifická omezení týkající se somatických variant:
 - Přístroj NovaSeq 6000Dx využívající pracovní postup analýzy generace Somatic FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky pro přiřazování somatických variant (tj. přítomnost somatických variant).
 - Pracovní postup analýzy generace Somatic FASTQ a VCF nedokáže rozlišit mezi germinální a somatickou variantou. Pracovní postup je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
 - Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založena na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádorové a normální tkáně.

- Pokud je ve stejném lokusu přiřazena víc než jedna variantní alela, žádná z alel nebude hlášena jako průchozí varianta. Místo toho bude hlášena celá sada alel, ale bude filtrována pomocí vícealelového tagu.

Postupy kontroly kvality

Při vyhodnocování každého běhu, vzorku a přiřazení báze bere software NovaSeq 6000Dx v úvahu metriky kontroly kvality. Při přípravě knihoven se doporučují pozitivní a negativní kontroly, které by měly být vyhodnoceny. Kontroly se hodnotí následovně.

- Negativní kontrola (kontrola bez templátu) nebo jiná negativní kontrola – musí generovat očekávaný výsledek. Pokud negativní kontrola generuje výsledek odlišný od očekávaného výsledku, došlo možná k chybě při sledování vzorku, nesprávnému záznamu indexačních primerů nebo kontaminaci.
- Vzorek s pozitivní kontrolou – musí vygenerovat očekávaný výsledek. Pokud pozitivní kontrola generuje výsledek odlišný od očekávaného výsledku, došlo možná k chybě při sledování vzorku nebo nesprávnému záznamu indexačních primerů.

Složky produktu

Illumina NovaSeq 6000Dx obsahuje následující:

1. Přístroj NovaSeq 6000Dx (Katalogové č. 20068232)
2. Softwarové komponenty pro Přístroj NovaSeq 6000Dx zahrnují následující:

Softwarová aplikace	Umístění instalace	Funkce	Popis
Obslužný software NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Řídí provoz přístroje	Obslužný software NovaSeq (NVOS) řídí provoz přístroje během sekvenování a vytváří snímky pro použití softwarem pro analýzu v reálném čase (RTA).
Software pro analýzu v reálném čase (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Provádí primární analýzu	Softwarová aplikace RTA převádí snímky generované pomocí NVOS pro každou dlaždici na cyklus běhu sekvenování do souborů přiřazení báze. Soubory přiřazení báze slouží jako vstupy pro aplikační moduly na Server Illumina DRAGEN pro NovaSeq 6000Dx. Softwarová aplikace RTA neobsahuje uživatelské rozhraní.
Illumina Run Manager	Server Illumina DRAGEN	Spravuje nastavení a řízení běhu	Illumina Run Manager zajišťuje správu uživatelů a přístrojů, slouží jako hostitel aplikačního softwaru a umožňuje použití hardwarově akcelerovaných modulů sekundární analýzy genomiky DRAGEN.

Provozní podmínky

Další informace o provozních podmínkách naleznete v části Poznámky k prostředí v *Dokumentace k přístroji NovaSeq 6000Dx*.

Prvek	Specifikace
Teplota	Teplotu v laboratoři udržujte v rozmezí 19 až 25 °C (22 °C ±3 °C). Tato teplota spadá do rozsahu provozní teploty přístroje. V průběhu sekvenačního běhu zabraňte změnám teploty prostředí o více než ±2 °C.
Vlhkost	Udržujte relativní vlhkost v rozmezí 20–80 % bez kondenzace. Systém by měl být provozován v nadmořské výšce 2 000 metrů nebo nižší.

Spotřební materiál a vybavení

Tato část uvádí vše potřebné pro sekvenační běh NovaSeq 6000Dx. Patří sem spotřební materiál dodávaný společností Illumina a pomocný spotřební materiál a vybavení, které je třeba zakoupit od jiných dodavatelů. Tyto položky jsou nutné k dokončení protokolu a k provádění postupů údržby a odstraňování problémů.

Informace o symbolech na spotřebním materiálu nebo jeho obalu viz [Přehled symbolů v produktu Illumina IVD \(dokument č. 1000000039141\)](#).

Spotřební materiál pro sekvenování

Běh NovaSeq 6000Dx vyžaduje následující komponenty:

- Kazeta s pufrem
- Klastrová kazeta
- Průtoková kvjeta
- Zkumavka knihovny
- Kazeta SBS

Spotřební materiál NovaSeq 6000Dx je balen v následujících konfiguracích. Každá komponenta používá radiofrekvenční identifikaci (RFID) pro přesné sledování spotřebního materiálu a kompatibility.

Tabulka 1 Spotřební materiál dodaný společností Illumina

Název sady	Obsah	Katalogové číslo Illumina
Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů)	Klastrová kazeta S2 Průtoková kyveta S2 Kazeta SBS S2	20046931
Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů)	Klastrová kazeta S4 Průtoková kyveta S4 Kazeta SBS S4	20046933
Kazeta s pufrem S2 NovaSeq 6000Dx	Kazeta s pufrem S2	20062292
Kazeta s pufrem S4 NovaSeq 6000Dx	Kazeta s pufrem S4	20062293
Zkumavka knihovny NovaSeq 6000Dx	Jedna zkumavka knihovny	20062290
NovaSeq 6000Dx Zkumavka knihovny, balení 24 ks	24 zkumavek knihovny	20062291

Po obdržení spotřebního materiálu ihned uskladněte jednotlivé součásti při uvedené teplotě, abyste zajistili jejich správnou funkčnost.

Tabulka 2 Skladování soupravy NovaSeq 6000Dx

Spotřební materiál	Množství	Skladovací teplota	Délka	Šířka	Výška
Průtoková kyveta	1	2 °C až 8 °C	27,7 cm	17 cm	3,8 cm
Klastrová kazeta	1	-25 °C až -15 °C	29,5 cm	13 cm	9,4 cm
Kazeta SBS	1	-25 °C až -15 °C	30 cm	12,4 cm	11,2 cm
Kazeta s pufrem	1	15 °C až 30 °C	42,2 cm	20,6 cm	21,1 cm
Zkumavka knihovny	1	15 °C až 30 °C	4,1 cm	2,3 cm	12,4 cm

Podrobnosti o spotřebním materiálu

K identifikaci kompatibilních součástí soupravy jsou průtokové kyvety a kazety označeny symboly, které ukazují režim soupravy.

Tabulka 3 Označení kompatibility

Režim sady	Označení na štítku	Popis
Komponenty sady S2	S2	Průtoková kyveta S2 generuje až 4,1 miliardy jednotlivých čtení procházejících filtrem s výstupem až 1000 Gb při 2 x 150 bp. Průtoková kyveta S2 zajišťuje rychlé sekvenování pro většinu aplikací s vysokou propustností.
Komponenty sady S4	S4	Průtoková kyveta S4 generuje až 10 miliard jednotlivých čtení procházejících filtrem s výstupem až 3000 Gb při 2 x 150 bp. Průtoková kyveta S4 je verze se čtyřmi drahami určená pro maximální výkon.

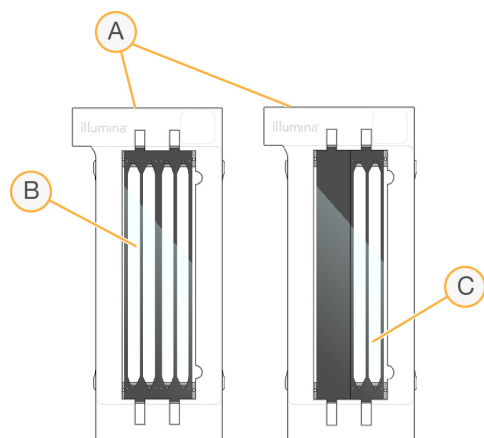
Průtoková kyveta

Průtoková kyveta NovaSeq 6000Dx je vzorovaná průtoková kyveta vložená do kazety. Průtoková kyveta je skleněný substrát obsahující miliardy uspořádaných nanoprvků. V nanoprvcích jsou generovány klastry, ze kterých se pak provádí sekvenování.

Každá průtoková kyveta má více drah pro sekvenační knihovny sloučené ve fondu. Průtoková kyveta S2 obsahuje dvě řady, zatímco průtoková kyveta S4 má čtyři. Každá dráha je snímána v několika záběrech a software poté rozděljuje obraz každého záběru na menší části nazývané dlaždice.

Některé škrábance a jiné drobné kosmetické vady průtokové kyvety jsou normální a neočekává se, že by ohrozily kvalitu dat a výtěžnost. Illumina doporučuje používat tyto průtokové kyvety obvyklým způsobem.

Obrázek 1 Průtokové kyvety



- A. Kazeta průtokové kyvety
- B. Průtoková kyveta se čtyřmi drahami (S4)
- C. Průtoková kyveta se dvěma drahami (S2)

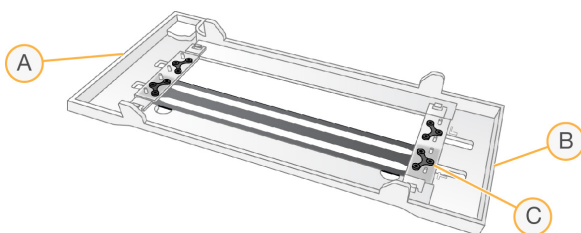
Spodní strana každé průtokové kyvety obsahuje několik těsnění. Knihovny a reagentie vstupují do drah průtokové kyvety skrze těsnění na vstupním konci průtokové kyvety. Použité reagentie jsou vytlačovány z drah přes těsnění na výstupním konci.



UPOZORNĚNÍ

Při manipulaci s průtokovou kyvetou se nedotýkejte těsnění.

Obrázek 2 Převrácená průtoková kyveta




- A. Výstupní konec
- B. Vstupní konec
- C. Těsnění (jedno ze čtyř)



Podrobnosti o pufrové, klastrové a SBS kazetě

Pufrové, klastrové a SBS kazety NovaSeq 6000Dx obsahují zásobníky s těsnicí fólií předplněné reagentiemi, pufrů a promývacím roztokem. Klastrové a SBS kazety jsou součástí sad reagentií NovaSeq 6000Dx. Kazeta s pufrům se prodává samostatně.

Kazety se zakládají přímo do přístroje a jsou barevně odlišeny a označeny tak, aby se omezil počet chyb při zakládání. Vodítka v chladicí jednotce reagentií a zásuvkách na pufr zajišťují správnou orientaci.

Tabulka 4 Kazety NovaSeq 6000Dx

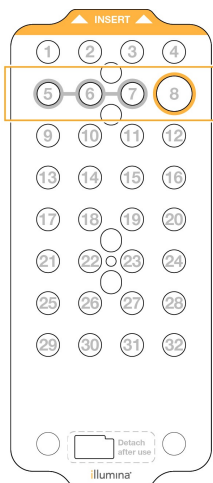
Spotřební materiál	Popis
Kazeta s pufrům	Je předplněna sekvenačními pufrů a váží až 6,8 kg. Plastová rukojeť usnadňuje přenášení, zakládání a vyjímání.
	Kazeta s pufrům obsahuje reagentie citlivé na světlo. Uchovávejte zásobník s pufrům zabalený až do použití.

Spotřební materiál	Popis
<p data-bbox="97 296 268 367">Klastrová kazeta</p> 	<p data-bbox="268 296 1417 409">Je předplněna klastrovacími a indexovacími reagensy a reagensy s párovými konci a rovněž promývacím roztokem. Zahrnuje určenou pozici pro zkumavku knihovny. Oranžové označení odlišuje klastrovou kazetu od SBS kazety.</p> <p data-bbox="268 451 1417 577">Denaturační reagent v pozici č. 30 obsahuje formamid, což je organický amid a reprodukční toxin. Tento zásobník je vyjímatelný, aby bylo možné po sekvenačním běhu snáze zlikvidovat nepoužité reagenty.</p>
<p data-bbox="97 590 268 661">Kazeta SBS</p> 	<p data-bbox="268 590 1417 745">Předplněné sekvenační reagenty v objemech specifických pro počet cyklů, které sada podporuje. Každá ze tří pozic pro reagenty má sousední pozici vyhrazenou pro automatické promývání po běhu. Oranžové označení odlišuje kazetu SBS od klastrové kazety.</p> <p data-bbox="268 787 1417 856">Kazeta SBS obsahuje reagenty citlivé na světlo. Uchovávejte obal SBS zabalený až do použití.</p>

Vyhrazené zásobníky klastrových kazet

Tři zásobníky jsou vyhrazeny pro vlastní primery a prázdná pozice je vyhrazena pro zkumavku knihovny. Z důvodu sledovatelnosti vzorků se zkumavka knihovny vkládá do klastrové kazety během nastavení cyklu a zůstává s ní až do konce běhu.

Obrázek 3 Číslované zásobníky



Tabulka 5 Zásobníky klastrových kazet

Pozice	Vyhrazeno pro
5, 6 a 7	Volitelné vlastní primery
8	Zkumavka knihovny

Spotřební materiál a vybavení dodávané uživatelem

Tabulka 6 Spotřební materiál

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Odstředivací lahvička, 500 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění roztoku Tween 20 pro udržovací promývání.
Odstředivací zkumavka, 30 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění NaOCl pro udržovací promývání.
Jednorázové rukavice, nepudrované	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Obecné účely.
Čistící ubrousky s isopropylalkoholem (70%) nebo Vlhčené ubrousky s etanolem, 70 %	VWR, katalogové č. 95041-714 nebo ekvivalentní Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Čištění komponent před během a pro obecné účely.
Laboratorní utěrky, netkané	VWR, katalogové č. 21905-026 nebo ekvivalentní	Sušení destičky průtokové kyvety a k obecným účelům.

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
NaOCl reagenční třídy, 5 %	Sigma-Aldrich, katalogové č. 239305	Provádění údržbového promývání.
Pipetovací špičky, 2 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Pipetování pro ředění a vkládání knihoven.
Pipetovací špičky, 20 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Pipetování pro ředění a vkládání knihoven.
Pipetovací špičky, 200 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Pipetování pro ředění a vkládání knihoven.
Pipetovací špičky, 1000 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Pipetování pro ředění a vkládání knihoven.
Isopropylalkohol (99 %) reagenční nebo spektrofotometrické třídy, 100ml lahvička	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Pravidelné čištění součástí optiky a čištění objektivu.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalogové č. P7949	Provádění údržbového promývání.
Voda, laboratorní jakost	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění roztoku Tween 20 a chlornanu sodného pro udržovací promývání.

Tabulka 7 Vybavení

Položka	Zdroj
Mraznička, -25 až -15 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Odměrný válec, 500 ml, sterilní	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kbelík na led	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipeta, 20 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipeta, 200 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipeta, 1000 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Chladnička, 2 °C až 8 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Nádoba, vodní lázně*	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

* Použijte nádobu, která pojme dvě kazety s reagensii a odpovídající množství vody. Například 61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm

Pokyny pro vodu laboratorní jakosti

Při provádění postupů na přístroji vždy používejte pouze vodu laboratorní jakosti nebo deionizovanou vodu. Nikdy nepoužívejte kohoutkovou vodu. Používejte pouze vodu následující nebo rovnocenné jakosti:

- Deionizovaná voda
- Illumina PW1
- Voda 18 megaohmů (MΩ)
- Voda Milli-Q
- Voda Super-Q
- Voda pro molekulární biologii

Návod k použití

Následující pokyny platí pro provoz Přístroj NovaSeq 6000Dx v režimu IVD při použití konfigurací sady S2 nebo S4.

Vytvoření běhu sekvenování

Pomocí následujících kroků vytvoříte pomocí softwaru Illumina Run Manager běh v režimu IVD nebo RUO. Případně vyberte možnost **Import Run** (Importovat běh) na kartě Planned (Plánované) na stránce Runs (Běhy) a importujte seznam vzorků. Nové běhy můžete vytvářet buď na přístroji, nebo prostřednictvím softwaru Illumina Run Manager prostřednictvím prohlížeče na počítači připojeném k síti.

POZNÁMKA Přesné informace požadované každou aplikací analýzy se liší, ale proces vytvoření běhu zahrnuje následující kroky.

1. Na kartě Planned (Plánované) na obrazovce Runs (Běhy) vyberte možnost **Create Run** (Vytvořit běh).
2. Vyberte aplikaci a poté vyberte **Next** (Další).
3. Pokračujte přes obrazovky nastavení. V závislosti na aplikaci mohou zobrazené obrazovky zahrnovat následující:
 - **Run Settings** (Nastavení běhu) – Zadejte parametry běhu.
 - **Sample Data** (Data vzorků) – Zadejte data vzorků ručně nebo importem souboru CSV, který obsahuje informace o vzorcích. Názvy vzorků musí být jedinečné.
 - **Analysis settings** (Nastavení analýzy) – Zadejte nastavení analýzy.
4. Na obrazovce Review (Kontrola) zkontrolujte informace o běhu a vyberte možnost **Save** (Uložit). Běh se přidá do horní části seznamu běhů na kartě Planned (Plánované).

Příprava spotřebního materiálu

Rozmrazování SBS a klastrových kazet

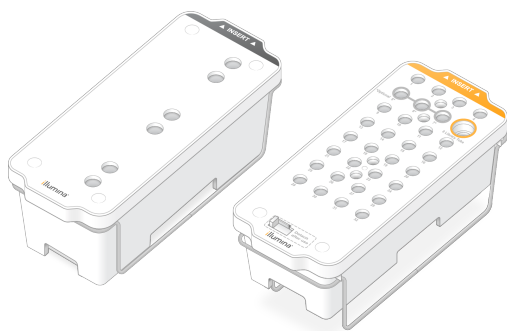


UPOZORNĚNÍ

Použití horké vody k rozmrazování reagentů může způsobit snížení kvality dat nebo selhání cyklu.

1. Pokud probíhá sekvenování, ujistěte se, že jsou po dokončení rozmrazování k dispozici obě strany přístroje.
2. Vyměňte SBS a klastrové kazety ze skladovacích prostor s teplotou -25 až -15 °C.
3. Každou kazetu vložte do drátěného rozmrazovacího stojanu. Stojany jsou dodávány s přístrojem a zabraňují převrácení ve vodní lázni.

Obrázek 4 Kazety v drátěných rozmrazovacích stojanech



4. Pomocí následující tabulky určete dobu rozmrazování. SBS a klastrové kazety rozmrazte ve vodní lázni při pokojové teplotě (19 °C až 25 °C) následujícím způsobem. Kazety ponořte přibližně do poloviny.

Kazeta	Doba rozmrazování
Kazeta SBS S2	4 hodiny
Klastrová kazeta S2	Až 2 hodiny
Kazeta SBS S4	4 hodiny
Klastrová kazeta S4	Až 4 hodiny



UPOZORNĚNÍ

Pokud sekvenování nezahájíte do čtyř hodin od rozmrazení kazet s reagenty, může to mít za následek sníženou kvalitu dat.

5. Základny kazet důkladně osušte papírovými utěrkami. Vysušte prostor mezi jamkami, abyste odstranili veškerou vodu.

6. Zkontrolujte, zda na fóliových těsněních není voda. Pokud je přítomna voda, osušte hadříkem nepouštějícím vlákna.
7. Zkontrolujte spodní stranu každé kazety a ujistěte se, zda jsou zásobníky bez ledu, což znamená, že čidla jsou rozmražená.
8. Desetkrát každou kazetu převratte, aby se reagentie promíchaly.



UPOZORNĚNÍ

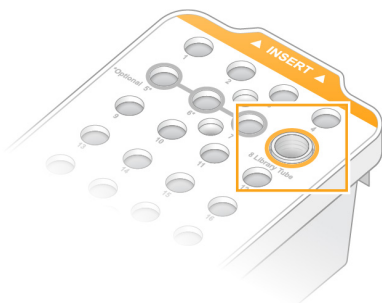
Nedostatečné převrácení kazet může mít za následek snížení kvality dat.

9. Opatrně poklepejte spodní stranou každé kazety o pracovní stůl, abyste zmenšili počet vzduchových bublinek.

Načtení zkumavky knihovny

1. Aniž byste narušili knihovnu na dně, vložte nezakrytou zkumavku s denaturovaným a naředěným fondem knihovny do pozice **Library Tube** (Zkumavka knihovny) (č. 8) klastrové kazety.
2. Vložte zkumavku knihovny do pozice č. 8 kazety clusteru.

Obrázek 5 Nezakrytá zkumavka knihovny načtená do polohy č. 8



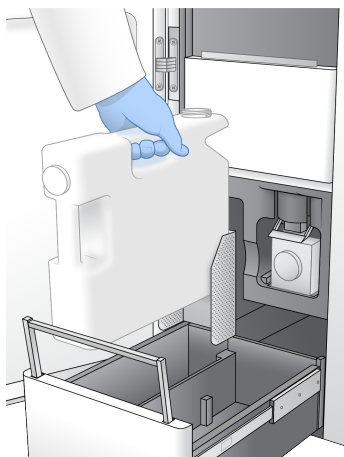
Prázdné použité lahvičky reagentů

Následující pokyny použijte k vyprázdnění použitých lahviček s reagenty při *každém* sekvenování. Pokud je systém nakonfigurován k externímu směrování použitých reagentů, malá lahvička shromažďuje použité reagentie a musí být vyprázdněna pro každý běh sekvenování. Velká lahvička musí být na místě.

1. Vyjměte a vyprázdňte malou lahvičku s použitou reagentií podle následujícího postupu.
 - a. Zvedněte páčku a vyjměte malou lahvičku s použitou reagentií z výklenku. Uchopte lahvičku za obě strany.
 - b. Sejměte závitový uzávěr z držáku na přední straně lahvičky.
 - c. Uzavřete otvor lahvičky uzávěrem, aby nedošlo k rozlítí.

- d. Obsah uchovávejte odděleně od obsahu druhé lahvičky a zlikvidujte jej v souladu s platnými normami pro váš region.
 - e. Vraťte neuzavřenou lahvičku do výklenku a poté posuňte páčku dolů. Uzávěr uložte do držáku.
2. Vyměte a vyprázdněte velkou lahvičku s použitou reagentií podle následujícího postupu.
 - a. Pomocí horní rukojeti vyjměte velkou lahvičku s použitou reagentií z levé strany zásuvky pro pufr.
 - b. Sejměte závitový uzávěr z držáku na přední straně lahvičky.
 - c. Uzavřete otvor lahvičky uzávěrem, aby nedošlo k rozlití.
 - d. Obsah zlikvidujte v souladu s platnými normami pro váš region. Při vyprazdňování uchopte obě rukojeti.
 - e. Vraťte neuzavřenou lahvičku do zásuvky s pufrům. Uzávěr uložte do držáku.

Obrázek 6 Vracení prázdné lahvičky



3. Nasadte si nový pár nepudrovaných rukavic.



UPOZORNĚNÍ

Po manipulaci s lahvičkou s použitou reagentií si vždy nasadte nový pár rukavic.

4. Zavřete zásuvku pufru a poté zavřete dvířka prostoru na tekutiny.



UPOZORNĚNÍ

Nevyprázdnění použitých lahviček s reagentiemi může mít za následek ukončení běhu a přetečení, které poškodí přístroj a představuje bezpečnostní riziko.

Příprava průtokové kyvety

1. Z úložiště s teplotou 2–8 °C vyjměte krabici s novou průtokovou kyvetou.
2. Odložte uzavřený obal průtokové kyvety stranou při okolní teplotě (19 °C až 25 °C) na 10–15 minut. Průtokovou kyvetu použijte do 12 hodin od vyjmutí z obalu.

Vkládání spotřebního materiálu

Následující pokyny použijte k zahájení postupu nastavení cyklu a vložení spotřebního materiálu.

1. V hlavní nabídce vyberte možnost **Sequence** (Sekvenovat) a poté vyberte jeden nebo dva cykly průtokové kyvety následujícím způsobem.
 - **A+B** – Nastavení běhu duální průtokové kyvety.
 - **A** – Nastavení běhu s jednou průtokovou kyvetou na straně A.
 - **B** – Nastavení běhu s jednou průtokovou kyvetou na straně B.Systém zahájí nastavení cyklu a začne založením průtokové kyvety.
2. Výběrem tlačítka **OK** potvrďte varování a otevřete dvířka průtokové kyvety.



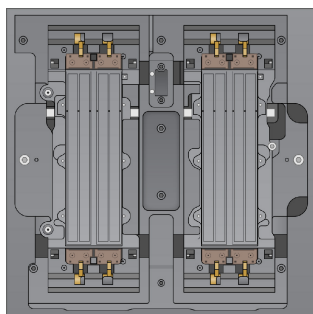
UPOZORNĚNÍ

Během sekvenačního běhu udržujte povrch čistý a neopírejte se o přístroj. Tlak na dvířka průtokové kyvety může způsobit jejich otevření, což zastaví běh. V zastavených bězích nelze pokračovat.

Vložení průtokové kyvety

1. Pokud je přítomna, vyjměte průtokovou kyvetu z předchozího běhu.
2. Pokud jsou na destičce průtokové kyvety viditelné částice, očistěte celou fázi, včetně fluidního rozhraní a skleněného povrchu optického vyrovnávacího cíle, a to ubrouskem napuštěným alkoholem. Osušte hadříkem nepouštějícím vlákna.

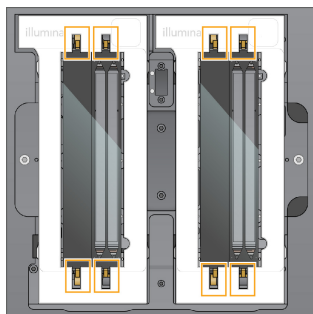
Obrázek 7 Destička průtokové kyvety



3. Z obalové fólie vyjměte průtokovou kyvetu následovně.
 - a. Nasadte si nový pár nepudrovaných rukavic, abyste zabránili znečištění skleněného povrchu průtokové kyvety.
 - b. Balení položte na rovnou plochu a odlepte fólii od rohového jazýčku.
 - c. Odstraňte průhledný plastový držák zakrývající průtokovou kyvetu.
 - d. Vyjměte průtokovou kyvetu z obalu. Uchopte průtokovou kyvetu za strany, abyste se nedotkli skla nebo těsnění na spodní straně.

- e. Pokud jsou na některém ze skleněných povrchů viditelné částice, očistěte příslušný povrch ubrouskem napuštěným alkoholem, který nepouští vlákna, a osušte laboratorním papírem s nízkým obsahem vláken.
 - f. Obal vhodně zlikvidujte.
4. Zarovnejte průtokovou kyvetu podle čtyř zarovnávacích svorek a umístěte ji na destičku průtokové kyvety.

Obrázek 8 Založené průtokové kyvety zarovnané přes svorky



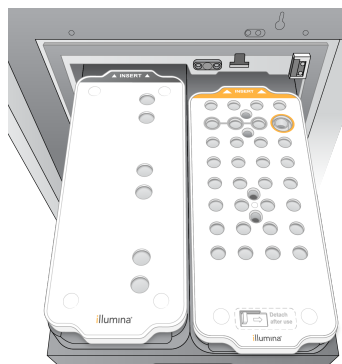
5. Vyberte možnost **Close Flow Cell Door** (Zavřít dvířka průtokové kyvety).
Dvířka průtokové kyvety se automaticky zavřou, na obrazovce se zobrazí ID průtokové kyvety a proběhne kontrola senzorů.

Založení SBS a klastrových kazet

1. Otevřete dvířka prostoru pro kapaliny a poté otevřete dvířka chladicího prostoru pro reagenty.
2. Pokud v přihrádce zůstala použitá kazeta SBS a klastrová kazeta z předchozího běhu, vyjměte je. Použité kazety mají propíchnuté fóliové těsnění.
3. Nepoužitý obsah zlikvidujte v souladu s platnými místními normami.
Informace o bezpečné likvidaci pozice č. 30 kazety klastru naleznete v části [Odpojovací pozice č. 30 na straně 21](#).

4. Připravené kazety vložte do zásuvky chladicí jednotky reagensů následujícím způsobem tak, aby štítky s nápisem Insert (Vložit) směřovaly k zadní části přístroje.
 - Kazetu SBS (šedý štítek) umístěte do levé polohy.
 - Umístěte klastrovou kazetu (oranžový štítek) obsahující neuzavřenou zkumavku s knihovnou do správné polohy.

Obrázek 9 Vložené kazety reagensů

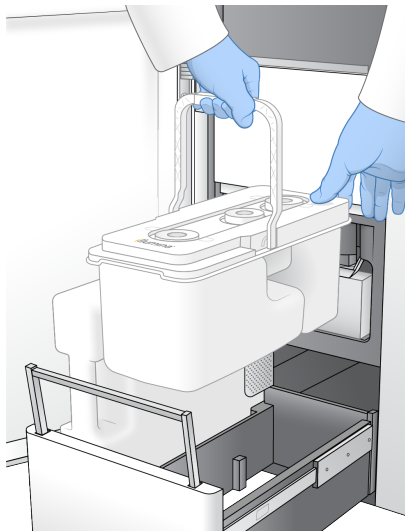


5. Zasuňte zásuvku do chladicí jednotky a zavřete dvířka chladicí jednotky reagensů. Zkontrolují se senzory a RFID. Na obrazovce se zobrazí ID pro zkumavku knihovny a dvě kazety.

Vložení kazety s pufrem

1. Zatažením za kovovou rukojeť otevřete zásuvku pufru.
2. Vyjměte použitou kazetu s pufrem z pravé strany zásuvky pufru. Použitá kazeta s pufrem má propíchnuté fóliové těsnění.
3. Vložte novou kazetu s pufrem do zásuvky tak, aby Illumina štítek směřoval k přední straně zásuvky. Vyrovnajte kazetu s vyvýšenými vodičky na dně a bocích zásuvky. Při správném vložení je zásobník rovnoměrně usazen a zásuvku lze zavřít.

Obrázek 10 Vložení kazety s pufrem



4. Pokud byly vyprázdněny obě použité lahvičky s reagensy, zaškrtněte políčko potvrzující, že obě použité lahvičky s reagensy jsou prázdné.

POZNÁMKA Nevyprázdnění použitých lahviček s reagensy může mít za následek ukončení běhu a přetečení, které poškodí přístroj a představuje bezpečnostní riziko.

5. Po přidání spotřebního materiálu pokračujte výběrem možnosti **Run Selection** (Výběr běhu).

Výběr a spuštění běhu

Přístroj naskenuje ID zkumavky knihovny a vyhledá odpovídající plánovaný běh.

1. Pokud je pro každou použitou stranu nalezen plánovaný běh odpovídající ID zkumavky knihovny, výběr běhů je přeskočen. Pokračujte výběrem možnosti **Review** (Kontrola).
2. Pokud pro jednu nebo obě strany neexistuje odpovídající běh, vyberte možnost **Run Selection** (Výběr běhu) a poté vyberte jeden nebo více plánovaných běhů.
Stejný plánovaný běh nelze vybrat na obou stranách.
3. Když je vybrán jeden nebo několik běhů, vyberte **Pre-Run Checks** (Kontroly před spuštěním běhu).
4. Počkejte přibližně 5 minut na dokončení kontroly před spuštěním běhu.
Běh se spustí automaticky po úspěšném dokončení.

POZNÁMKA Aby nedošlo k nadměrnému využití kapacity pevného disku, nekopírujte po spuštění běhu žádná data do složky C:\\.

Chyby kontroly před spuštěním běhu

1. Pokud kontroly před spuštěním běhu selžou z důvodu chyby snímače, například není zjištěna průtoková kyveta, je nutné pracovní postup ukončit a restartovat.
2. U ostatních selhání kontroly před spuštěním běhu vyberte možnost **Retry** (Opakovat) pro opětovné spuštění neúspěšné kontroly nebo **Retry All** (Opakovat vše) pro opětovné spuštění všech kontrol. Chyby je nutné před spuštěním běhu vyřešit.
3. Výběrem ikony **Error** (Chyba) zobrazíte podrobnosti o chybě.
4. Pokud kontrola zarovnání selže, vyřešte chybu následujícím způsobem.
 - a. Pro návrat na Load (Načítání) zvolte **Reload** (Znovu načíst) a poté **OK**.
 - b. Odstraňte všechny položky z horní části přístroje a poté vyberte **OK**. Otevrou se dvířka průtokové kyvety.
 - c. Znovu vložte průtokovou kyvetu a vyberte možnost **Run Setup** (Nastavení běhu).
 - d. Pokračujte přes všechny obrazovky, aby se znovu načetlo každé RFID, a vraťte se na obrazovku Pre-Run Checks (Kontroly před spuštěním běhu).
 - e. Znovu proveďte kontrolu.

Sledování postupu běhu






Během prováděného běhu se na obrazovce Sequencing (Sekvenování) zobrazují následující podrobnosti. Obrazovka Sequencing (Sekvenování) je přístupná z hlavní nabídky.

- **Stav jednotlivých kroků běhu**
- **Time to completion** (Čas do dokončení) – Datum a čas dokončení běhu (rrrr-mm-dd hh:mm).
- **Run progress** (Průběh běhu) – Aktuální krok běhu. Velikost proužku postupu neodpovídá rychlosti běhu každého kroku.
- **Q-scores** (Skóre kvality) – Zobrazuje distribuci skóre kvality (Q-score).
- **Intensity** (Intenzita) – Zobrazuje hodnotu klastrů intenzity 90. percentilu pro každou dlaždici. Barvy grafů označují červené a zelené kanály.
- **Clusters passing filter (%)** (Klastry procházející filtrem (%)) – Zobrazuje procento klastrů, které procházejí filtrem.
- **Projected Total Yield (GB)** (Předpokládaný celkový výtěžek (GB)) – Předpokládaný výtěžek za běh průtokové kyvety. Pokud jsou zvoleny metriky vztažené na dráhu (H), zobrazené hodnoty představují aktuální výtěžek na dráhu a v průběhu běhu se aktualizují podle cyklu.
- **Q30** – Procento přiřazení báze pro běh, které mají skóre kvality ≥ 30 .

Stavové ikony

Stavová ikona na rozhraní NVOS značí stav běhu. Číslo na ikoně signalizuje počet podmínek daného stavu.

Když se změní stav běhu, ikona se rozblíká. Chcete-li získat popis tohoto stavu, vyberte ikonu. Výběrem možnosti **Acknowledge** (Potvrdit) zprávu vymažete a následně zavřete dialogové okno pomocí možnosti **Close** (Zavřít).

Stavová ikona	Název stavu	Popis
	Stav v pořádku	Systém je normální.
	Zpracování	Systém provádí zpracování.
	Varování	Došlo k varování a je vyžadována vaše pozornost. Varování nezastaví běh ani nevyžadují nápravnou akci, které by podmiňovala další pokračování.
	Chyba	Došlo k chybě. Chyby vyžadují nápravnou akci, než bude možné pokračovat v běhu.
	Informace	K dispozici je nekritická zpráva.

Metriky běhu

Software zobrazuje metriky generované během běhu. Metriky se zobrazují ve formě diagramů, grafů a tabulek založených na datech generovaných pomocí RTA3 a zapsaných do souborů InterOp.

Klastrování trvá přibližně 2 hodiny, poté sekvenování začíná 1. cyklem. Metriky jsou v průběhu sekvenování aktualizovány. Klastry procházející filtrem, výtěžek a skóre kvality jsou k dispozici po 26. cyklu. Před 26. cyklem nejsou vyplněny žádné hodnoty a jsou označeny jako neplatné.

Po sekvenování

Následující části uvádějí pokyny ke krokům, které proběhnou po dokončení sekvenování.

Automatické promytí po běhu

Po dokončení sekvenování software spustí automatické promytí po běhu, které trvá přibližně 80 minut. Systém načerpá 0,24% chlornan sodný (NaOCl) z polohy č. 17 a zředí jej na 0,12 %. 0,12% NaOCl je čerpán do pozic reagentů a knihovny ExAmp přes průtokovou kyvetu a poté do lahvíček použitých reagentů. Promývací roztok vypláchne templát ze systému, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci.

Po dokončení promývání se systém uvede do bezpečného stavu a aktivuje se tlačítko Home (Domů). Ponechte spotřební materiál na místě až do dalšího běhu. Po promytí nasávací trubičky zůstávají v SBS a kazetách clusteru, aby se do systému nedostal vzduch. Nasávací trubičky v kazetě s pufrem jsou zvednuté, aby bylo možné vyprázdnit použité lahvičky reagentů. Poté se přes všechna vedení přečerpá promývací pufr, aby se ze systému odstranil NaOCl a reagentie.

POZNÁMKA Pokud dojde k chybě během automatického promývání po běhu a promývání po běhu je neúplné, je nutné provést údržbové promývání.

Odpojovací pozice č. 30

Zásobník v pozici č. 30 kazety klastru obsahuje formamid. Je třeba jej odebrat z použité klastrové kazety a zlikvidovat samostatně.



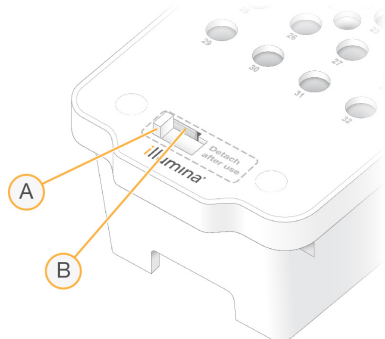
UPOZORNĚNÍ

Tato sada reagentů obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.

1. V rukavicích zatlačte bílý plastový jazýček s nápisem **Detach after use** (Odpojit po použití) doprava.
2. Položte ruku nebo pevný povrch pod nádržku a stiskněte průhledný plastový jazýček směrem ke štítku Illumina, aby se nádržka uvolnila zpod kazety klastru.

POZNÁMKA Při skladování se vyhněte ukládání kazet na sebe. Mohly by dojít k náhodnému odpojení zásobníku.

Obrázek 11 Vyjímatelná pozice č. 30



- A. Bílý plastový jazýček k odpojení
- B. Průhledný plastový jazýček k odpojení

3. Zásobník zlikvidujte v souladu s platnými místními normami.

Výstupní data sekvenování

Během sekvenování se data automaticky přenášejí z Přístroj NovaSeq 6000Dx do Server Illumina DRAGEN. Po dokončení primární analýzy a přenosu dat může sekundární analýza prováděná na Server Illumina DRAGEN začít automaticky s použitím možností analýzy definovaných aplikací vybranou v Illumina Run Manager. Získané výsledky závisí na možnostech zvolených během nastavení běhu. Chcete-li zobrazit výsledky z běhu, vyberte požadovaný název běhu na kartě Completed (Dokončeno) na obrazovce Runs (Běhy). Výstupní soubory naleznete také v umístění uvedeném na obrazovce Instrument Settings (Nastavení přístroje).

Analýza v reálném čase

Přístroj NovaSeq 6000Dx využívá software RTA3, který je implementací softwaru Analýza v reálném čase na výpočetním modulu (CE) přístroje. RTA3 extrahuje intenzity z obrazů získaných z kamery, přiřazuje báze, přiřazuje skóre kvality přiřazením bází, provádí zarovnání s kontrolou PhiX a vykazuje data v souborech InterOp. Za účelem optimalizace doby zpracování ukládá software RTA3 informace do paměti. Dojde-li k ukončení softwaru RTA3, zpracování nepokračuje a případná zpracovávaná data běhu jsou z paměti ztracena.

Vstupy softwaru RTA3

RTA3 aby v místní paměti systému byly obrazy dlaždic za účelem zpracování. RTA3 přijímá informace o běhu a příkazy ze softwaru NVOS.

Výstupy softwaru RTA3

RTA3Obrazy pro každý kanál jsou v paměti předávány do softwaru jako dlaždice. Z těchto obrazů vytváří software RTA3 jako výstup sadu souborů přiřazení báze a souborů filtrů se skóre kvality. Všechny ostatní výstupy jsou podpůrné výstupní soubory.

Typ souboru	Popis
Soubory přiřazení báze	Každá analyzovaná dlaždice je uvedena v souboru zřetěženého přiřazení báze (*.cbcl). Dlaždice ze stejné dráhy a povrchu jsou agregovány do jednoho souboru CBCL pro každou dráhu a povrch.
Soubory filtrů	Každá dlaždice produkuje soubor filtru (*.filter). Ten určuje, zda klastr prochází filtry.

Software RTA3 poskytuje metriky kvality běhu v reálném čase uložené jako soubory InterOp, které jsou binárním výstupem obsahujícím metriky dlaždice, cyklu a úrovně čtení.

Nakládání s chybami

Software RTA3 vytváří soubory protokolů a zapisuje je do složky Logs (protokoly). Chyby jsou zaznamenávány do textového souboru ve formátu *.log.

Následující soubory protokolu jsou na konci zpracování přesunuty do finální výstupní složky:

- Soubor `info_00000.log` shrnuje důležité události běhu.
- Soubor `error_00000.log` obsahuje chyby, ke kterým došlo během běhu.
- Soubor `warning_00000.log` obsahuje varování, ke kterým došlo během běhu.

Dlaždice průtokové kyvety

Dlaždice jsou malé zobrazovací oblasti na průtokové kyvetě. Kamera pořídí jeden snímek každého záběru, který software rozdělí na dlaždice pro zpracování softwarem RTA3. Celkový počet dlaždic závisí na tom, kolik drah, záběrů a povrchů je zobrazeno na průtokové kyvetě.

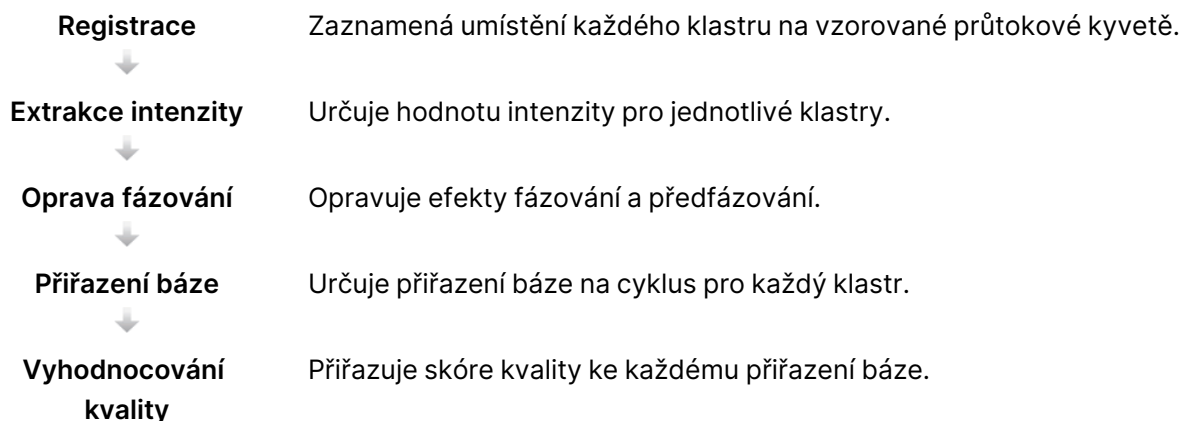
- Průtokové kyvety S2 mají celkem 1408 dlaždic.
- Průtokové kyvety S4 mají celkem 3744 dlaždic.

Komponenta průtokové kyvety	S2	S4	Popis
Dráhy	2	4	Dráha představuje fyzický kanál se vstupními a výstupními porty.
Povrchy	2	2	Průtokové kyvety S2 a S4 jsou snímány na dvou površích: na horním a dolním. Horní povrch dlaždice je nasnímán jako první.
Záběry na dráhu	4	6	Záběr představuje sloupec v dráze průtokové kyvety, který kamera zachytí jako jeden naskenovaný snímek.
Dlaždice na záběr	88	78	Dlaždice je část záběru, která znázorňuje zobrazovanou oblast na průtokové kyvetě.
Celkový počet vygenerovaných dlaždic	1408	3744	Celkový počet dlaždic se rovná součinu dráhy × povrchy × záběry × dlaždice na záběr.

Název dlaždice je pětímístné číslo, které představuje polohu dlaždice na průtokové kyvetě. Například název dlaždice 1_1205 označuje dráhu 1, horní povrch, záběr 2, dlaždici 5.

- První číslice je číslo dráhy:
 - 1 nebo 2 pro průtokovou kyvetu S2.
 - 1, 2, 3 nebo 4 pro průtokovou kyvetu S4.
- Druhá číslice představuje povrch: 1 znamená horní povrch, 2 spodní.
- Třetí číslice představuje číslo záběru:
 - 1, 2, 3 nebo 4 pro průtokovou kyvetu S2.
 - 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6 pro průtokovou kyvetu S4.
- Poslední dvě číslice představují číslo dlaždice. Číslování začíná číslem 01 na výstupním konci průtokové kyvety a končí číslem 88 či 78 na vstupním konci.
 - 01 až 88 pro průtokovou kyvetu S2.
 - 01 až 78 pro průtokovou kyvetu S4.

Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis



Registrace

Registrace zaručí obraz k otočené čtvercové oblasti nanoprvků na vzorované průtokové kyvetě. Z důvodu seřazeného uspořádání nanoprvků jsou souřadnice X a Y pro každý klastr v dlaždici předem určeny. Polohy klastrů jsou zapsány pro každý běh v souboru umístění klastrů (s.locs).

Pokud se u některých obrazů v cyklu registrace nezdaří, pro dotyčnou dlaždici v cyklu se nevytvoří žádná přiřazení databáze.

Extrakce intenzity

Extrakce intenzity vypočítá po registraci hodnotu intenzity pro každý nanoprvěk v daném obraze. Pokud se registrace nezdaří, nelze intenzitu dané dlaždice extrahovat.

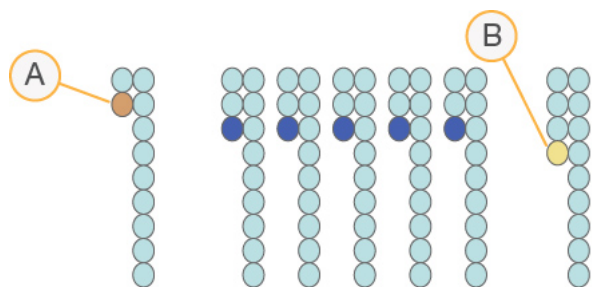
Oprava fázování

Během sekvenační reakce se jednotlivá vlákna DNA v klastru prodlouží o jednu bázi na cyklus. K fázování a předfázování dochází, když se vlákno dostane mimo fázi s aktuálním cyklem začleňování.

K fázování dochází, když se zpozdí začleňování báze.

K předfázování dochází, když začleňování báze poskočí dopředu.

Obrázek 12 Fázování a předfázování



- A. Čtení s báží, která fázuje.
- B. Čtení s báží, která předfázuje.

RTA3 opravuje účinky fázování a předfázování, což maximalizuje kvalitu dat v každém cyklu během běhu.

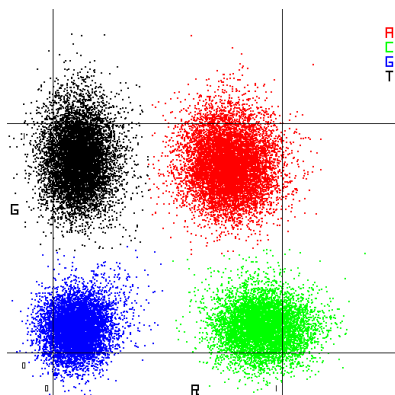
Přiřazení báze

Přiřazení báze určuje bázi (A, C, G nebo T) pro každý klastr dané dlaždice v konkrétním cyklu. Přístroj NovaSeq 6000Dx používá dvoukanálové sekvenování, které vyžaduje k zakódování dat pro 4 báze DNA pouze dva snímky, jeden ze zeleného a jeden z červeného kanálu.

Pokud nedojde k přiřazení, je to označeno jako N. K nepřičazení dochází, když klastr nevyhoví filtru, když se nezdaří registrace nebo když se klastr posune mimo obraz.

Intenzity jednotlivých klastrů jsou extrahovány z červených a zelených obrazů a vzájemně porovnány. Výsledkem jsou čtyři samostatné populace. Každá populace odpovídá bázi. Proces přiřazení báze určuje, do které populace každý klastr patří.

Obrázek 13 Vizualizace intenzit klastrů



Tabulka 8 Přiřazení báze při dvoukanálovém sekvenování

Báze	Červený kanál	Zelený kanál	Výsledek
A	1 (zapnuto)	1 (zapnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu v červených i zelených kanálech.
C	1 (zapnuto)	0 (vypnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v červeném kanálu.
G	0 (vypnuto)	0 (vypnuto)	Klastry, které nevykazují intenzitu v žádném známém umístění klastrů.
T	0 (vypnuto)	1 (zapnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v zeleném kanálu.

Klastry procházející filtrem

Během běhu RTA3 filtruje nezpracovaná data, aby odebral čtení, která nedosahují prahové hodnoty kvality dat. Klastry, které se překrývají nebo mají nízkou kvalitu, budou odebrány.

V případě dvoukanálové analýzy využívá RTA3 systém založený na populacích, aby určil ryzost (míru intenzity čistoty) přiřazení báze. Klastry projdou filtrem (PF), když v prvních 25 cyklech maximálně jedno přiřazení báze nedosáhne pevné prahové hodnoty ryzosti. Pokud je součástí zarovnání PhiX, provede se ve 26. cyklu na podskupině dlaždic u klastrů, které vyhověly filtru. Na klastry, které filtrem neprojdou, se nepoužije přiřazení báze a nebudou zarovnány.

Skóre kvality

Skóre kvality představuje předpověď pravděpodobnosti nesprávného přiřazení báze. Vyšší skóre kvality naznačuje, že přiřazení báze má vyšší kvalitu a s větší pravděpodobností bude správné. Po stanovení skóre kvality se výsledky zaznamenají do souborů CBCL.

Skóre kvality stručnou formou informuje o pravděpodobnosti malých chyb. Skóre kvality je uváděno ve formě Q (X), kde X je příslušné skóre. Následující tabulka ukazuje vztah mezi skórem kvality a pravděpodobností chyby.

Skóre kvality Q(X)	Pravděpodobnost chyby
Q40	0,0001 (1 z 10 000)
Q30	0,001 (1 z 1 000)
Q20	0,01 (1 ze 100)
Q10	0,1 (1 z 10)

Vyhodnocování a vykazování kvality

Vyhodnocování kvality vypočítá sadu předpovědí pro jednotlivá přiřazení báze a potom hodnoty indicíí použije k vyhledání skóre kvality v tabulce kvality. Tabulky kvality jsou vytvořeny tak, aby poskytovaly optimálně přesné předpovědi kvality pro běhy generované prostřednictvím specifické konfigurace platformy pro sekvenování a verze chemického složení.

Vyhodnocování kvality je založeno na upravené verzi algoritmu programu Phred.

Za účelem vytvoření tabulky kvality pro Přístroj NovaSeq 6000Dx byly určeny tři skupiny přiřazení báze založené na klastrování těchto specifických prediktivních funkcí. Po seskupení přiřazení báze byla empiricky vypočtena střední hodnota chyby pro každou ze třech skupin a příslušná skóre kvality byla zaznamenána v tabulce kvality společně s prediktivními funkcemi vztaženými k dané skupině. Z tohoto důvodu jsou v softwaru RTA3 možná pouze tři skóre kvality. Tato skóre kvality představují průměrnou hodnotu chyby skupiny. Výsledkem je zjednodušené, přesto velmi přesné vyhodnocení kvality. Tyto tři skupiny v tabulce kvality odpovídají marginálnímu (< Q15), střednímu (~Q20) a kvalitnímu (> Q30) přiřazení báze a jsou jim přiřazena konkrétní skóre kvality 12, 26 a 34. Případům bez přiřazení báze je přiřazeno „nulové“ skóre 2. Tento model vykazování skóre kvality snižuje požadavky na velikost úložiště a šířku pásma, aniž by to mělo vliv na přesnost nebo výkon.

Obrázek 14 Zjednodušené vyhodnocení kvality pomocí softwaru RTA3





Výstupní soubory sekvenování

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory přiřazení báze	Každý analyzovaný klastř je zahrnut v souboru přiřazení báze, v němž jsou data agregovaná do jednoho souboru pro každý cyklus, dráhu a povrch. Agregovaný soubor obsahuje přiřazení báze a zakódované skóre kvality pro každý klastř. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, například L001_1.cbcl
Soubory umístění klastřů	Pro každou průtokovou kyvetu existuje binární soubor umístění klastřů, který obsahuje souřadnice XY klastřů v dlaždici. Souřadnice jsou předem určeny šestihranným uspořádáním, které odpovídá uspořádání nanoprvků průtokové kyvety. Data\Intensities s_[lane].locs
Soubory filtrů	Soubor filtru vymezuje, zda klastř projde filtry. Soubory filtrů jsou vytvářeny ve 26. cyklu a využívají data z předchozích 25 cyklů. Pro každou dlaždici je vytvořen jeden soubor filtru. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Informační soubor běhu	Uvádí název běhu, počet cyklů v každém čtení, informaci o tom, zda je toto čtení čtením indexů, a počet záběrů a dlaždic na průtokové kyvetě. Soubor s informacemi o běhu se vytváří na začátku běhu. [Root folder], RunInfo.xml
Soubory miniatur	Miniatury pro první cyklus každého sekvenačního čtení. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] – Soubory jsou uloženy v podsložce pro každý cyklus. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg – Miniatura snímku obsahuje číslo dlaždice.

Struktura výstupní složky sekvenování

Software NVOS vytváří název výstupní složky automaticky.

 **Config** (Konfigurace) – Nastavení konfigurace běhu


 **Logs** (Protokoly) – Soubory protokolů popisující provozní kroky, analýzu přístroje a události RTA3

 SampleSheet.csv – Seznam vzorků nebo jiný příložený soubor, je-li k dispozici

 **Data**

 **Intensities** (Intenzity)

 **BaseCalls**

 **L00[X]** – Soubory přiřazení báze (*.cbcl) agregované do jednoho souboru na dráhu, povrch a cyklus

 s.locs – Soubor umístění klastřů pro běh

📁 **InterOp** – Binární soubory

📁 **Recipe** (Návod) – Soubor s návodem specifický pro daný běh

📁 **Thumbnail Images** (Miniatury) – Miniatury pro každou 10. dlaždici

📁 **LIMS** – Soubor nastavení běhu (*.json), je-li to relevantní.

📁 **Audit**

📄 AuditInfo.xml

📄 RTA3.cfg

📄 RunInfo.xml

📄 RunParameters.xml

📄 RTAComplete.txt

📄 CopyComplete.txt

📄 SequenceComplete.txt

📄 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

📄 Manifest.tsv

Varování a preventivní opatření



UPOZORNĚNÍ

Podle federálních zákonů se prodej tohoto zdravotnického prostředku omezuje na prodej lékařem nebo jiným držitelem povolení k používání tohoto zdravotnického prostředku či vystavení poukazu na tento prostředek v daném státě nebo na prodej na základě jimi vystaveného poukazu.

- **Některé komponenty reagensů, které dodává Illumina pro použití s přístrojem Přístroj NovaSeq 6000Dx, obsahují potenciálně nebezpečné chemikálie. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensy nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi.** Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.
- Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagensů používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagensů si důkladně umyjte ruce.
- Dodržujte postupy správné laboratorní praxe a hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci reagensů, nástrojů a genomických vzorků DNA produkty PCR. Kontaminace PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.

- Aby se zabránilo kontaminaci, dbejte, aby oblasti před amplifikací a po amplifikaci měly specializované vybavení a spotřební materiál (např. pipety, špičky pipet, tepelné bloky, vortexery a centrifugy).
- Párování indexů se vzorky vyžaduje přesné sladění s rozvržením desky indexu. Aplikace DNA Prep with Enrichment automaticky vyplní indexovými primery spojené s názvy vzorků, pokud jsou zadány během nastavení běhu. Doporučuje se, aby uživatel před spuštěním běhu sekvenování ověřil spojení indexových primerů a vzorků. Rozdíly mezi vzorky a rozvržením desky vyústí ve špatnou identifikaci pozitivních vzorků a vykázaní nesprávných výsledků.
- Instalace Důrazně se doporučuje, aby si uživatel nainstaloval antivirový software, který bude počítač chránit proti virům.
- Přístroj NovaSeq 6000Dx nepoužívejte, pokud je z něj sejmuto kterýkoliv z krycích panelů. Používání přístroje, když jsou sejmuty některé z panelů, představuje riziko úrazu střídavým nebo stejnosměrným elektrickým proudem.
- Nedotýkejte se průtokové kyvety v prostoru průtočné cely. Ohřívač v tomto prostoru může mít teplotu 22 °C až 95 °C a může způsobit popáleniny.
- Přibližná hmotnost přístroje je 480 kg, takže v případě pádu nebo nevhodného zacházení může způsobit vážné poranění osob.

Charakteristiky účinnosti

Výkonnostní charakteristiky přístroje NovaSeq 6000Dx byly stanoveny pomocí Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pro přípravu knihovny, Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů) pro sekvenování a aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pro sekundární analýzu včetně detekce germinální a somatické varianty. Studie zahrnovaly indexování vzorků, přenos vzorků, vstup DNA, analytickou citlivost (mez blanku / mez detekce), přesnost, konzistenci výsledků, porovnání metod a reprodukovatelnost. Viz *Příbalový leták k Illumina DNA Prep with Enrichment Dx*, kde najdete výkonnostní charakteristiky související s preanalytickými faktory, jako jsou metody extrakce nebo interferující látky.

Definice výpočtů používaných v charakteristikách účinnosti

1. Procento pozitivní shody (PPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako varianty a jsou rozbohem správně vykázané.
 - $(\text{počet lokusů varianty správně vykázaných rozbohem}) / (\text{celkový počet lokusů varianty})$Lokusy varianty vykázané rozbohem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně pozitivní (TP). Lokusy varianty vykázané rozbohem jako referenční přiřazení nebo jiná přiřazení varianty jsou falešně negativní (FN).
2. Procento negativní shody (NPA) se počítá jako poměr lokusů, které jsou referenční metodou klasifikovány jako divoký typ a jsou rozbohem správně vykázané.
 - $(\text{počet lokusů divokého typu správně vykázaných rozbohem}) / (\text{celkový počet lokusů divokého typu})$

Lokusy divokého typu vykázané rozbořem, které jsou shodné s referenční metodou, jsou skutečně negativní (TN). Lokusy divokého typu vykázané rozbořem jako varianty jsou falešně pozitivní (FP).

3. Celková procentuální shoda (OPA) se počítá jako poměr lokusů správně vykázaných rozbořem vzhledem k referenční metodě.
 - $$\frac{((\text{počet lokusů varianty správně vykázaných rozbořem}) + (\text{počet lokusů divokého typu správně vykázaných rozbořem}))}{((\text{celkový počet lokusů varianty}) + (\text{celkový počet lokusů divokého typu}))}$$
4. Výpočty PPA, NPA a OPA nezahrnují případy bez přiřazení (varianta nebo referenční lokus nespĺňují podmínky jednoho nebo více kvalitativních filtrů).
5. Procento pozitivních přiřazení (PPC) je počet pozorování se zjištěnou variantou děleno celkovým počtem testovaných pozorování s výjimkou neplatných pozorování nebo pozorování filtrovaných jako malá hloubka.
6. Procento negativních přiřazení (PNC) je vypočteno jako počet pozorování s referencí, které prošly, jako výsledkem na pozici děleno celkovým počtem testovaných pozorování s výjimkou neplatných pozorování nebo pozorování filtrovaných jako malá hloubka.
7. Procentuální autozomová přiřaditelnost se vypočítá jako procento referenčních pozic non-N v cílových oblastech u autozomálních chromozomů s úspěšným přiřazením genotypu.

Indexování vzorků

Indexační primery vzorků přidané během přípravy knihovny přiřazují každému vzorku DNA jedinečnou sekvenci. Tyto jedinečné sekvenční sekvence umožňují sloučit více vzorků do jednoho sekvenčního běhu. Indexování vzorků se používá pro germinální i somatické pracovní postupy. Účelem této studie bylo stanovit minimální (12) a maximální (192) počet vzorků, které mohou být zpracovány pomocí Přístroj NovaSeq 6000Dx v jediném sekvenčním běhu. Dvanáct jedinečných vzorků DNA genomu Platinum Genome (NA12877–NA12888) bylo testováno s nejméně 12 různými kombinacemi indexačních primerů na vzorek. Knihovny vzorků byly připraveny pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Výsledky vzorků ze čtyř sérií sekvenování pomocí pracovního postupu analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx byly porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0.

Pro první sadu běhů bylo 192 unikátně indexovaných knihoven vzorků sekvenováno ve dvou sekvenčních bězích, po jednom s reagensy S2 a S4, aby se ověřil maximální počet podporovaných indexů a schopnost rozboru konzistentně provádět genotypová přiřazení u daného vzorku s různými kombinacemi indexačních primerů. Pro druhou sadu běhů bylo 12 jedinečně indexovaných knihoven vzorků sekvenováno ve dvou sekvenčních bězích, po jednom s reagensy S2 a S4, aby se ověřil minimální počet podporovaných indexů.

Pro běhy se 192 indexy se PPA pro SNV pohybovalo od 99,7 % do 100 %, PPA pro inzerce bylo 100 %, PPA pro delece se pohybovalo od 96,7 % do 100 % a NPA bylo 100 %. Pro běhy s 12 indexy se PPA pro SNV pohybovalo od 99,7 % do 100 %, PPA pro inzerce se pohybovalo od 89,6 % do 100 %, PPA pro delece se pohybovalo od 94,6 % do 100 % a NPA bylo 100 %.

Přenos vzorků

Přístroj NovaSeq 6000Dx umožňuje sekvenování více vzorků a kontrol v jednom sekvenačním běhu. Byla provedena studie k vyhodnocení rozsahu přenosu vzorků v rámci sekvenačního běhu (v rámci běhu) a mezi sekvenačními běhy (mezi běhy). Dvanáct vzorků DNA genomu Platinum Genome, šest mužských a šest ženských, bylo testováno pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy, včetně obou pohlavních chromozomů. Knihovny byly sekvenovány na přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx pomocí pracovního postupu analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Přenos vzorků mužů do vzorků žen byl pozorován prostřednictvím přítomnosti cílových čtení chromozomu Y v ženských vzorcích.

K přenosu v rámci běhu může dojít během generování klastru, přiřazování báze indexového cyklu a demultiplexování vzorků. Pro testování přenosu vzorků v sekvenačním běhu byl fond knihovny sestávající nejméně z dvanácti replikátů každého jedinečného mužského a ženského vzorku plus dvou kontrol bez templátu, celkem 192 jedinečně indexovaných knihoven, sekvenován na přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx ve dvou sekvenačních bězích, po jednom s reagensy S2 a S4. Přenos vzorků v rámci běhu byl hodnocen porovnáním cílového pokrytí chromozomu Y každého ženského replikátu s průměrným cílovým pokrytím chromozomu Y všech mužských replikátů ve fondu. 95. percentil pozorovaného přenosu v rámci běhu byl 0,0090 % pro reagenzie S2 a 0,041 % pro reagenzie S4.

Pro testování přenosu vzorků mezi běhy byly připraveny dva fondy knihoven, které byly sekvenovány postupně na jednom přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx, na straně A pomocí reagensí S4 a na straně B pomocí reagensí S2. První fond obsahoval alespoň dvanáct replikátů šesti jedinečných ženských vzorků a dvě kontroly bez templátu, celkem tedy 96 jedinečně indexovaných knihoven. Druhý fond obsahoval alespoň dvanáct replikátů šesti jedinečných mužských vzorků a dvě kontroly bez templátu, celkem tedy 96 jedinečně indexovaných knihoven. Oba fondy používaly stejnou sadu indexových adaptérů. Nejprve byl sekvenován ženský fond, následoval sekvenční běh s mužským fondem a po něm následoval další opakovaný sekvenační běh s ženským fondem. Přenos vzorků mezi běhy byl hodnocen podle typu reagenzie, S2 a S4, porovnáním cílového pokrytí chromozomů Y mezi odpovídajícími replikáty opakovaného běhu ženského fondu a běhu mužského fondu. 95. percentil pozorovaného přenosu mezi běhy byl 0,0089 % pro reagenzie S2 a 0,012 % pro reagenzie S4.

Vstup DNA

Krev (germinální)

Vstupní rozsah krevní DNA pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pomocí aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx byl stanoven pro NovaSeq 6000Dx. To bylo vyhodnoceno provedením studie sériového ředění s použitím osmi vzorků DNA Platinum Genome (NA12877 – NA12884) pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Knihovny byly sekvenovány na jednom zařízení Přístroj NovaSeq 6000Dx pomocí jedné šarže Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a jedné šarže Sada reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů).

Sedm vzorků bylo testováno duplicitně při šesti úrovních vstupů DNA v rozmezí od 1000 ng do 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 10 ng). Osmý vzorek (NA12884) byl testován jako jeden replikát při vstupu 10 ng a duplicitně pro všechny ostatní úrovně vstupu. Pro stanovení přesnosti byly genotypy vzorků porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0. Výsledky byly stanoveny pro každou úroveň vstupu. PPA pro každý typ varianty (SNV, inzerce a delece) je uvedeno ve [Výsledky PPA pro každý vstup krevní DNA podle typu varianty na straně 33](#). NPA je prezentováno v [NPA pro každý vstup DNA na straně 33](#). Všechny úrovně vstupu měly podobnou přesnost. Doporučený vstup krevní DNA pro Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je 50–1000 ng, přičemž 1000 ng a 10 ng poskytují horní a dolní limit pro splnění výkonnostních charakteristik při sekvenování na přístroji NovaSeq 6000Dx.

Tabulka 9 Výsledky PPA pro každý vstup krevní DNA podle typu varianty

Vstup DNA (ng)	Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	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	Inzerce	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	Delece	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	

Tabulka 10 NPA pro každý vstup DNA

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)
10	115449045	384	285751	> 99,9
25	123012157	415	438153	> 99,9
50	122985299	369	465043	> 99,9

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Referenční případy bez přiřazení	NPA (%)
100	122976660	321	473730	> 99,9
250	122971099	331	479289	> 99,9
1000	122978527	324	471882	> 99,9

FFPE (somatická)

Pro NovaSeq 6000Dx byl stanoven vstupní rozsah DNA fixované formalínem a zalité do parafínu (FFPE) pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. To bylo vyhodnoceno provedením studie sériového ředění s použitím dvou vzorků Platinum Genome a pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Knihovny byly sekvenovány na jednom zařízení Přístroj NovaSeq 6000Dx pomocí jedné šarže Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a jedné šarže Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů).

Vzorek DNA GM12877 byl zředěn pomocí vzorku DNA GM12878 za účelem vytvoření GM12877-13 s jedinečnými heterozygotními a homozygotními variantami GM12877 při frekvencích blízkých 6,5 % a 13 %. Byla také testována neředitelná GM12877. GM12877-13 byla testována duplicitně při čtyřech úrovních vstupu DNA v rozmezí od 1000 ng do 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng a 25 ng). GM12877 byla testována jako jeden replikát při vstupu 250 ng a duplicitně pro všechny ostatní úrovně vstupu. Pro stanovení přesnosti byly přiřazené varianty vzorků porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0. Výsledky byly stanoveny pro každou úroveň vstupu. PPA pro každý typ varianty (SNV, inzerce a delece) je uvedeno ve [Výsledky PPA pro každý vstup FFPE DNA podle typu varianty a cílové VAF na straně 34](#). NPA je prezentováno v [NPA pro každý vstup FFPE DNA na straně 35](#). Všechny úrovně vstupu měly podobnou přesnost. Pro vzorky FFPE s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$ je doporučený vstup DNA pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx 50–1000 ng, přičemž 1000 ng a 25 ng poskytují horní a dolní limit pro splnění výkonnostních charakteristik při sekvenování na přístroji NovaSeq 6000Dx.

Tabulka 11 Výsledky PPA pro každý vstup FFPE DNA podle typu varianty a cílové VAF

		VAF cílového ředění									
		0,065					0,13				
Vstup DNA (ng)	Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA (%)	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	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	Inzerce	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

VAF cílového ředění											
0,065							0,13				
Vstup DNA (ng)	Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA (%)	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA (%)
25	Delece	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

Tabulka 12 NPA pro každý vstup FFPE DNA

Vstup DNA (ng)	Očekávaný divoký typ	TN	FP	Referenční případy bez přiřazení	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

Analytická citlivost (mez blanku [LoB] a mez detekce [LoD])

Tato studie byla provedena za účelem vyhodnocení meze blanku (Limit of Blank, LoB) a meze detekce (Limit of Detection, LoD) pro pracovní postup analýzy generování Somatic FASTQ and VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx. Studie byla provedena s použitím reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Buněčné linie GM12878 a GM12877 genomu Platinum Genome byly fixovány formalínem a zality do parafínu s následnou extrakcí DNA. Ředění GM12877 do GM12878 byla připravena tak, aby vzorky obsahovaly 0 %, 4 %, 6,5 % a 13 % objemu GM12877, takže frekvence 489 jedinečných variant GM12877 (454 SNV, 17 inzercí a 18 delecí) se pohybovaly mezi 0 a 0,13. Knihovny vzorků byly připraveny za použití dvou šarží reagensů sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a sekvenovány během šesti po sobě jdoucích počátečních dnů se dvěma Přístroj NovaSeq 6000Dx a vždy dvěma šaržemi Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a dvěma šaržemi Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů), celkem tedy dvanácti sekvenačními běhy. Výsledkem bylo 288 pozorování pro každou variantu v každém z ředění vzorku. LoB a LoD se vypočítaly klasickou metodou uvedenou v CLSI EP17-A2. LoB a LoD se vypočítaly pro reagensie S2 a S4 odděleně sloučením frekvencí všech variant v sekvenačním běhu pro každý typ reagensie. Chyba I. typu byla definována jako 0,01 a chyba II. typu jako 0,05.

LoB byla hodnocena pro 489 lokusů nezávisle napříč dvěma šaržemi sekvenování pro každý typ reagensie (S2 nebo S4) a přípravu knihovny. Pro reagensie S2 byl 95. percentil LoB 2,9 %. Pro reagensie S4 byl 95. percentil LoB 2,2 %.

LoD byl úspěšně vypočten pro 478 ze 489 variant pro S2 a 485 ze 489 variant pro S4. Varianty, kde nebyl stanoven žádný LoD pro jeden nebo obě přípravy knihovny, byly z konečného přiřazení LoD pro systém NovaSeq 6000Dx vyloučeny. LoD systému NovaSeq 6000Dx s reagensy S2 a S4 byl stanoven 95. percentilem jednotlivých variant LoD. Pro reagenty S2 byl 95. percentil napříč 478 variantami LoD 4,8 %. Pro reagenty S4 byl 95. percentil napříč 485 variantami LoD 3,9 %.

Přesnost

Germinální

Následující studie byla provedena za účelem posouzení přesnosti přiřazení variant pracovního postupu analýzy generování Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx s pomocí Sada reagentů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů). Pomocí reprezentativního rozboru se testovaly čtyři jedinečné vzorky Platinum Genome DNA za účelem vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází (9 232 cílů) napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Každý ze vzorků byl testován ve 12 replikátech s výjimkou NA12880, které byly testovány v 11 replikátech. Celkem bylo provedeno 18 běhů pomocí tří sekvenačních přístrojů, tří šarží reagentů S2 a dvou operátorů během šesti počátečních dnů. Porovnáním výsledků s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0 byla stanovena přesnost pro SNV, inserce a delece.

Tabulka 13 Shrnutí germinální shody

Kritéria	Celkový počet pozorování ¹	Výsledek pozorování ²	Výsledek podle běhu ³
PPA pro SNV	846	99,8	99,9
PPA pro inserce	846	97,9	> 99,9
PPA pro delece	846	96,9	99,9
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹Vypočteno jako počet vzorků na běh (47) x počet běhů (18) = 846.

²Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátu vzorku napříč všemi 18 běhy.

³Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

Germinální shoda na vzorek na straně 38 obsahuje údaje ze studie prezentované s pozitivní a negativní procentuální shodou podle vzorků, přičemž jsou výsledky variant porovnány s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0 pro výpočty PPA. Kombinují se tři typy variant (SNV, inserce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a insercí/delece, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 14 Germinální shoda na vzorek

Vzorek	Přiraditelnost autozomů	Očekávané varianty ¹	TP	FN	Varianty bez přiřazení	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 Celkový počet variant ve všech replikátech vzorků napříč 18 běhy.

Germinální shoda na vzorek podle typu varianty na straně 38 obsahuje data studie uváděná jako vztažená ke vzorku, přičemž jsou výsledky varianty porovnány s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inzerce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 15 Germinální shoda na vzorek podle typu varianty

Vzorek	SVN			Inzerce			Delece		
	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	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

U vzorků se dále analyzovala přiřazení malých inzercí a delecí (indelů). Celkové shrnutí je uvedeno v *Souhrn detekce germinálních indelů na straně 39*. Celkem se vyskytlo 210 indelů o délce 1–18 bp v případě inzercí a 1–21 bp v případě delecí.

Tabulka 16 Souhrn detekce germinálních indelů

Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA
Inzerce	36954	36953	1	0	> 99,9
Delece	29358	28986	16	356	99,9

Reprezentativní rozbor se skládal z 9 232 cílů zahrnujících různý obsah genomu. Obsah GC cílů se pohyboval v rozmezí 0,20–0,86 %. V cílech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Data sestavená pro každý chromozom za účelem stanovení vlivu obsahu genomu na procentuální hodnotu správných přiřazení jsou uvedena v části [Germinální přesnost na úrovni chromozomu na straně 39](#). Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytují nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %.

Tabulka 17 Germinální přesnost na úrovni chromozomu

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Inzerce (18), Delece (4)	[0.22 - 0.8]; Medián: 0,51	114888718	34	966860	> 99,9	0,83

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Inzerce (5), Delece (2)	[0.24 - 0.81]; Medián: 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), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Inzerce (11), Delece (1)	[0.25 - 0.86]; Medián: 0,45	114625053	2	226461	> 99,9	0,20

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Inzerce (2), Delece (2)	[0.27 - 0.77]; Medián: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Inzerce (8), Delece (18)	[0.29 - 0.79]; Medián: 0,46	75314497	912	153061	> 99,9	0,20

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Inzerce (4), Delece (2)	[0.24 - 0.79]; Medián: 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), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Inzerce (1), Delece (4)	[0.2 - 0.77]; Medián: 0,46	132534074	19	246884	> 99,9	0,19

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Inzerce (4), Delece (1)	[0.26 - 0.78]; Medián: 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), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Inzerce (4), Delece (1)	[0.27 - 0.83]; Medián: 0,49	72650800	20	241991	> 99,9	0,33

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Inzerce (1), Delece (1)	[0.23 - 0.78]; Medián: 0,44	55539058	1	188216	> 99,9	0,34
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Inzerce (2), Delece (2)	[0.28 - 0.8]; Medián: 0,47	75744222	742	259258	> 99,9	0,34

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Inzerce (1), Delece (5)	[0.26 - 0.77]; Medián: 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), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Inzerce (14), Delece (0)	[0.28 - 0.79]; Medián: 0,42	48503179	1	45666	> 99,9	0,09

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Inzerce (4), Delece (1)	[0.29 - 0.77]; Medián: 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), Trinukleotid (8), Inzerce (4), Delece (6)	[0.29 - 0.76]; Medián: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Inzerce (15), Delece (21)	[0.3 - 0.76]; Medián: 0,54	65490245	16	1438278	> 99,9	2,15

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Inzerce (18), Delece (16)	[0.28 - 0.82]; Medián: 0,49	97929929	417	335905	> 99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Inzerce (4), Delece (0)	[0.22 - 0.78]; Medián: 0,44	15967171	312	42077	> 99,9	0,26
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Inzerce (2), Delece (21)	[0.33 - 0.83]; Medián: 0,59	85642066	3	678213	> 99,9	0,79

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Inzerce (5), Delece (0)	[0.31 - 0.84]; Medián: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Inzerce (2), Delece (5)	[0.22 - 0.78]; Medián: 0,52	25319736	50	57434	> 99,9	0,23
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Inzerce (6), Delece (0)	[0.27 - 0.74]; Medián: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Inzerce (3), Delece (0)	[0.2 - 0.72]; Medián: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Inzerce (0), Delece (0)	[0.4 - 0.59]; Medián: 0,45	0	0	0	Není k dispozici	Není k dispozici

Výsledky sekvenování vzorku NA12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 9232 cílů bylo 8009 cílů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 776 cílů mělo částečné překrytí a 447 cílů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Výsledkem bylo 1 831 483 souřadnic na replikát pro porovnání. Nevariantní přiřazení báze se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky přesnosti jsou uvedeny v [Germinální shoda vzorku NA12878 s databází NIST na straně 49](#).

Tabulka 18 Germinální shoda vzorku NA12878 s databází NIST

Vzorek	Počet zahrnutých cílů	Přiřaditelnost autozomů	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	> 99,9	> 99,9	> 99,9

Na základě dat poskytnutých v této 18běhové germinální studii lze tvrdit, že Přístroj NovaSeq 6000Dx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC \geq 20 % (všechny přiřazené báze v 1692 sekvenovaných cílových oblastech s 20% obsahem GC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0 %)
- Obsah GC \leq 86 % (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s 86% obsahem GC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0 %)
- Délky polyA \leq 46 (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 46 polyA byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,27 %)
- Délky polyT \leq 40 (13384074 z 13384321 přiřazených bází v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 40 polyT bylo přiřazeno správně s mírou variant bez přiřazení 0,26 %)
- Délky polyG \leq 11 (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 11 polyG byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0 %)
- Délky polyC \leq 8 (9815030 z 9815035 přiřazených bází v 5922 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 8 polyC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,53 %)
- Délky opakování dinukleotidů \leq 31x (32233922 z 32233926 přiřazených bází v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 31 dinukleotidů byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,21 %)
- Délky opakování trinukleotidů \leq 23x (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 23 trinukleotidů byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,21 %)
- Délky inzerce \leq 18 (všechny přiřazené báze v 1692 sekvenovaných cílových oblastech s inzercí 18 byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 7,71 %)
- Délky delece \leq 21 (všechny přiřazené báze v 1692 sekvenovaných cílových oblastech s delecí 21 byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 1,14 %)

Somatická

Popsaná studie byla provedena za účelem posouzení přesnosti přiřazení variant pracovního postupu analýzy generování Somatic FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na přístroji Přístroj NovaSeq 6000Dx s pomocí Sada reagensů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů).

Tato studie použila reprezentativní rozbor navržený k vyhledávání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází (9 232 cílů) napříč všemi 23 lidskými chromozomy. DNA genomu Platinum Genome byla extrahována z bloků zpracovaných pomocí FFPE za účelem vytvoření čtyř jedinečných vzorků pro vyhodnocení ve studii.

Vzorek DNA GM12877 byl zředěn pomocí vzorku DNA GM12878 za účelem vytvoření GM12877-13 s jedinečnými heterozygotními a homozygotními variantami GM12877 při frekvencích blízkých 6,5 % a 13 %. Vzorek DNA GM12878 byl obdobně zředěn pomocí vzorku DNA GM12877 za účelem vytvoření GM12878-13 s jedinečnými heterozygotními a homozygotními variantami GM12878 při frekvencích blízkých 6,5 % a 13 %. Rovněž byly testovány neřaděné vzorky GM12877 a GM12878. Každý ze vzorků byl testován ve 12 replikátech s výjimkou neřaděných GM12878, které byly testovány v jedenácti replikátech. Celkem bylo provedeno osmnácti běhů pomocí tří sekvenačních přístrojů, tří šarží reagentů S4 a dvou operátorů během šesti počátečních dnů. Porovnáním výsledků s genomy Platinum Genome verze 2016-1.0 byla stanovena přesnost pro SNV, inserce a delece.

Tabulka 19 Souhrn somatických shod

Kritéria	Počet pozorování ¹	Výsledek pozorování ²	Výsledek podle běhu ³
PPA pro somatické SNV	846	99,8	98,9
PPA pro somatické inserce	846	100	100
PPA pro somatické delece	846	100	100
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹ Vypočteno jako = počet vzorků na běh (47) x počet běhů (18) = 846.

² Nejnižší pozorovaná hodnota podle replikátu vzorku napříč všemi 18 běhy.

³ Nejnižší hodnota, když jsou data z každého cyklu analyzována souhrnně.

[Somatická shoda na vzorek na straně 51](#) obsahuje údaje ze studie prezentované s procentem pozitivní a negativní shody podle vzorků, přičemž pro výpočty PPA se výsledky variant porovnávají s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Kombinují se tři typy variant (SNV, inserce, delece). Protože referenční metoda poskytuje výsledky pouze jednonukleotidových variant a inzercí/delecí, pro výpočet NPA se výsledky nevariantních bází porovnají s referenční sekvencí lidského genomu hg19.

Tabulka 20 Somatická shoda na vzorek

Vzorek	Přiřaditelnost autozomů	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	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

Vzorek	Přiraditelnost autozomů	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	TN	FP	PPA	NPA	OPA
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

Somatická shoda na vzorek podle typu varianty na straně 52 obsahuje data studie uváděná jako vztažená ke vzorku, přičemž jsou výsledky varianty porovnány s dobře charakterizovanou kompozitní referenční metodou. Detekce se pro každý typ varianty – SNV, inserce a delece – hodnotí samostatně. Referenční pozice jsou vyloučeny.

Tabulka 21 Somatická shoda na vzorek podle typu varianty

Vzorek	SNV			Inzerce			Delece		
	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	TP	FN	Očekávaná hodnota	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

U čtyř vzorků se dále analyzovala přiřazení malých inzercí a delecí (indelů). Celkové shrnutí je uvedeno v *Souhrn detekce somatických indelů na straně 52*. Celkem se vyskytlo 210 indelů o délce 1–18 bp v případě inzercí a 1–21 bp v případě delecí.

Tabulka 22 Souhrn detekce somatických indelů

Typ varianty	Očekávané varianty	TP	FN	Varianty bez přiřazení	PPA
Inzerce	11772	11772	0	0	100
Delece	10098	9666	0	432	100

Reprezentativní rozbor se skládal z 9 232 cílů zahrnujících různý obsah genomu. Obsah GC cílů se pohyboval v rozmezí 0,20–0,86 %. V cílech se také opakoval jeden nukleotid (např. Poly A, Poly T), dinukleotidy a trinukleotidy. Data sestavená pro každý chromozom za

účelem stanovení vlivu obsahu genomu na procentuální hodnotu správných přiřazení jsou uvedena v části [Somatická přesnost na úrovni chromozomu na straně 53](#). Procento správných přiřazení tvoří přiřazení variant a referenční přiřazení, a pokud se vyskytnou nesprávná přiřazení nebo varianty bez přiřazení, je nižší než 100 %.

Tabulka 23 Somatická přesnost na úrovni chromozomu

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Inzerce (3), Delece (0)	[0.22 - 0.8]; Medián: 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), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Inzerce (5), Delece (1)	[0.24 - 0.81]; Medián: 0,44	126795713	842	5850393	> 99,9	4,4

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Inzerce (1), Delece (1)	[0.25 - 0.86]; Medián: 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), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Inzerce (0), Delece (1)	[0.27 - 0.77]; Medián: 0,45	59373461	16	2517412	> 99,9	4,1

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Inzerce (8), Delece (18)	[0.29 - 0.79]; Medián: 0,46	72261191	723	3116981	> 99,9	4,1
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Inzerce (0), Delece (1)	[0.24 - 0.79]; Medián: 0,48	98593101	687	4890221	> 99,9	4,7

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Inzerce (1), Delece (4)	[0.2 - 0.77]; Medián: 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), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Inzerce (4), Delece (0)	[0.26 - 0.78]; Medián: 0,47	53430489	175	2958909	> 99,9	5,2

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Inzerce (0), Delece (1)	[0.27 - 0.83]; Medián: 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), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Inzerce (0), Delece (0)	[0.23 - 0.78]; Medián: 0,44	53209592	90	2469444	> 99,9	4,4

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Inzerce (2), Delece (2)	[0.28 - 0.8]; Medián: 0,47	72291795	150	3665560	> 99,9	4,8
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Inzerce (0), Delece (3)	[0.26 - 0.77]; Medián: 0,49	96109352	101	4331932	> 99,9	4,3

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Inzerce (14), Delece (0)	[0.28 - 0.79]; Medián: 0,42	46130028	44	2384839	> 99,9	4,9
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Inzerce (4), Delece (0)	[0.29 - 0.77]; Medián: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Inzerce (4), Delece (0)	[0.29 - 0.76]; Medián: 0,46	41918631	184	1753300	> 99,9	4,0

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Inzerce (15), Delece (21)	[0.3 - 0.76]; Medián: 0,54	62344351	18	4540539	> 99,9	6,8
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Inzerce (18), Delece (1)	[0.28 - 0.82]; Medián: 0,49	93811318	414	4403622	> 99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Inzerce (0), Delece (0)	[0.22 - 0.78]; Medián: 0,44	15007653	6	990633	> 99,9	6,2

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Inzerce (2), Delece (3)	[0.33 - 0.83]; Medián: 0,59	81416722	455	4860311	> 99,9	5,6
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Inzerce (5), Delece (0)	[0.31 - 0.84]; Medián: 0,53	26833936	7	1301905	> 99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Inzerce (1), Delece (0)	[0.22 - 0.78]; Medián: 0,52	24169250	44	1172087	> 99,9	4,6

Chromozom	Počet genů	Počet cílů	Počet bází	Obsah genomu	Rozsah GC	Správná přiřazení	Nesprávná přiřazení	Bez přiřazení	% správných přiřazení	% bez přiřazení
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Inzerce (6), Delece (0)	[0.27 - 0.74]; Medián: 0,51	28887217	86	1392179	> 99,9	4,6
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Inzerce (3), Delece (0)	[0.2 - 0.72]; Medián: 0,48	64231080	241	3852253	> 99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Inzerce (0), Delece (0)	[0.4 - 0.59]; Medián: 0,45	0	0	0	Není k dispozici	Není k dispozici

Výsledky sekvenování vzorku GM12878 se porovnaly s velmi spolehlivým genotypem NA12878 stanoveným National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19). Ze 9232 cílů bylo 8009 cílů obsaženo ve velmi spolehlivých genomových oblastech, 776 cílů mělo částečné překrytí a 447 cílů nemělo v sekvenci NIST žádné překrytí. Výsledkem bylo 1 831 483 souřadnic na replikát pro porovnání. Nevariantní přiřazení báze se porovnala s referenční sekvencí lidského genomu hg19. Výsledky přesnosti jsou uvedeny v [Somatická shoda vzorku GM12878 s databází NIST na straně 63](#).

Tabulka 24 Somatická shoda vzorku GM12878 s databází NIST

Vzorek	Počet zahrnutých cílů	Přiřaditelnost autozomů	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	> 99,9	> 99,9

Na základě dat poskytnutých v této 18-běhové somatické studii lze tvrdit, že Přístroj NovaSeq 6000Dx dokáže konzistentně sekvenovat:

- Obsah GC ≥ 20 % (všechny přiřazené báze v 1692 sekvenovaných cílových oblastech s 20% obsahem GC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 0,34 %)
- Obsah GC ≤ 86 % (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s 86% obsahem GC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 4,21 %)
- Délky polyA ≤ 46 (14550082 z 14550083 přiřazených bází v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 46 polyA byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 4,18 %)
- Délky polyT ≤ 40 (12833489 z 12833491 přiřazených bází v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 40 polyT bylo přiřazeno správně s mírou variant bez přiřazení 4,37 %)
- Délky polyG ≤ 11 (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 11 polyG byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 7,59 %)
- Délky polyC ≤ 8 (9405604 z 9405615 přiřazených bází v 5922 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 8 polyC byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 4,68 %)
- Délky opakování dinukleotidů $\leq 31x$ (30996684 z 30996712 přiřazených bází v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 31 dinukleotidů byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 4,04 %)
- Délky opakování trinukleotidů $\leq 23x$ (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s opakováním 23 trinukleotidů byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 5,39 %)
- Délky inzerce ≤ 18 (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s inzerací 18 byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 1,44 %)

- Délky delece ≤ 21 (všechny přiřazené báze v 846 sekvenovaných cílových oblastech s delecí 21 byly přiřazeny správně s mírou variant bez přiřazení 7,86 %)

Přesnost

Přesnost Přístroj NovaSeq 6000Dx byla hodnocena pomocí vzorků genomu Platinum Genome a pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy s použitím 9 232 cílových oligonukleotidů. Celkem bylo hodnoceno 1723 cílených malých variant (SNV, inzerce a delece). Germinální testování sestávalo z jedenácti nebo dvanácti replikátů čtyř jedinečných vzorků genomu Platinum Genome. Somatické testování sestávalo z jedenácti nebo dvanácti replikátů čtyř jedinečných vzorků genomu Platinum Genome zpracovaných pomocí FFPE při různých úrovních VAF. Knihovny vzorků byly připraveny pomocí reagentů sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Testování bylo provedeno na jednom interním pracovišti pomocí tří přístrojů Přístroj NovaSeq 6000Dx, tří šarží Sada reagentů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a tří šarží Sada reagentů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů) a dvou operátorů během šesti počátečních dnů. Pro každý počáteční den byly knihovny germinálních vzorků sekvenovány na jedné straně přístroje pomocí reagentů S2 a pracovního postupu analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a knihovny somatických vzorků byly sekvenovány na druhé straně přístroje pomocí reagentů S4 a pracovního postupu analýzy generace Somatic FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Výsledkem tohoto testování bylo 18 průtokových kyvet pro každý germinální a somatický pracovní postup.

Germinální

U germinálních běhů jsou místa genomu, kde je detekována cílová germinální varianta, hlášena jako pozitivní (varianta). U očekávaných pozitivních germinálních variant byly údaje hodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procento pozitivních přiřazení (PPC) v rámci každého typu varianty (SNV, Inzerce, delece).

Pozorování konzistence výsledků germinálních přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty na straně 65 shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 25 Pozorování konzistence výsledků germinálních přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná pozitivní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Inzerce	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Delece	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Pozitivní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde je detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Místa genomu, kde není detekována cílová varianta, jsou hlášena jako negativní (divoký typ). U očekávaných negativních míst byly údaje vyhodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procenta negativních přiřazení (PNC). [Pozorování konzistence výsledků germinálních přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných negativních výsledků na straně 66](#) shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 26 Pozorování konzistence výsledků germinálních přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných negativních výsledků

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná negativní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Divoký typ	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Negativní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde není detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Příspěvek každého parametru (přístroj, šarže reagentie, den, replikát knihovny) k celkové variabilitě byl stanoven analýzou komponent rozptylu s použitím frekvence variant jako proměnné odpovědi. Celková směrodatná odchylka měla střední hodnotu 0,0370. Největším přispěvatelem k variabilitě frekvencí variant byly replikáty z přípravy knihovny, které přispěly k 17,1 % celkové variability. Den přispěl k 1 %, zatímco přístroj a šarže reagentií každý přispěly k méně než 1 % celkové variability. [Odhady složek rozptylu přesnosti v rámci laboratoře pro frekvence variant germinálních vzorků na straně 66](#) (SD = směrodatná odchylka).

Tabulka 27 Odhady složek rozptylu přesnosti v rámci laboratoře pro frekvence variant germinálních vzorků

Komponenta	Průměrná SD	Průměrné % z celkové SD
Den	0,0020	1,028
Přístroj	0,0018	0,837
Šarže spotřebního materiálu	0,0016	0,712
Replikát knihovny	0,0143	17,110
Celkem	0.0370	100

Somatická

U somatických běhů jsou místa genomu, kde je detekována cílová somatická varianta, hlášena jako pozitivní (varianta). U zředěných vzorků GM12877-13 a GM12878-13 s očekávanými pozitivními somatickými variantami ve VAF mezi 6,5 % a 13 % byly údaje hodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procenta pozitivních přiřazení (PPC) v rámci každého typu varianty (SNV, inzerce, delece). [Pozorování přesnosti somatických](#)

[přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty \(VAF je \$\geq 6,5\%\$ a \$\leq 13\%\$ \) na straně 67](#) shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 28 Pozorování přesnosti somatických přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty (VAF je $\geq 6,5\%$ a $\leq 13\%$)

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná pozitivní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Inzerce	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Delece	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Pozitivní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde je detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Místa genomu, kde není detekována cílená somatická varianta, jsou hlášena jako negativní (divoký typ). U očekávaných negativních míst byly údaje vyhodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procenta negativních přiřazení. [Pozorování přesnosti somatických přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných negativních výsledků na straně 67](#) shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 29 Pozorování přesnosti somatických přiřazení v rámci laboratoře u očekávaných negativních výsledků

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná negativní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Divoký typ	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Negativní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde není detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Příspěvek každého parametru (přístroj, šarže reagentie, den, replikát knihovny) k celkové variabilitě byl stanoven analýzou komponent rozptylu s použitím frekvence variant jako proměnné odpovědi. Celková směrodatná odchylka měla střední hodnotu 0,0062. Replikáty z přípravy knihovny zůstaly nejvýznamnějším zdrojem variability a představovaly 50,7 % z celkové hodnoty. Den, přístroj a šarže spotřebního materiálu přispěly jednotlivě k méně než 1 % celkové variability. [Odhady složek rozptylu přesnosti v rámci laboratoře pro frekvence variant somatických vzorků na straně 68](#) (SD = směrodatná odchylka).

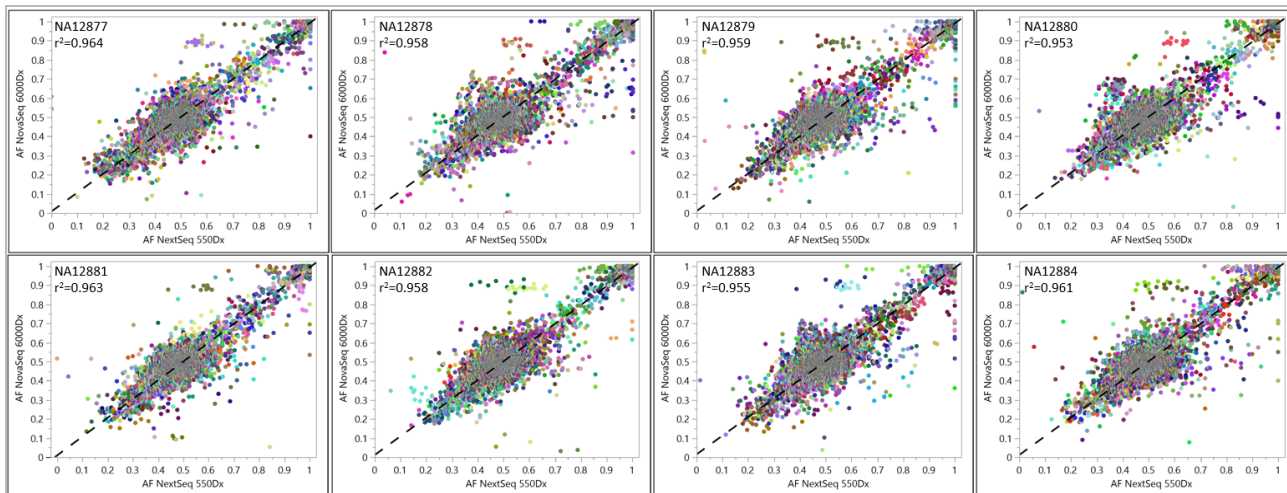
Tabulka 30 Odhady složek rozptylu přesnosti v rámci laboratoře pro frekvence variant somatických vzorků

Komponenta	Průměrná SD	Průměrné % z celkové SD
Den	0,0002	0,41
Přístroj	0,0002	0,40
Šarže spotřebního materiálu	0,0002	0,35
Replikát knihovny	0,0044	50,7
Celkem	0,0062	100

Porovnání metod

Byla provedena studie pro porovnání účinnosti mezi NovaSeq 6000Dx přístroji a NextSeq 550Dx. Shoda frekvencí variant u vzorků krve byla hodnocena pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Bylo testováno osm vzorků DNA genomu Platinum Genome, sedm v replikátech po šesti a jeden (NA12881) v replikátech po pěti. Knihovny byly sekvenovány na Přístroj NovaSeq 6000Dx pomocí pracovního postupu analýzy generace Germline FASTQ and VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a na přístroji NextSeq 550Dx pomocí modulu DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager. *Korelační grafy frekvencí variant (Body jsou barevně odlišeny podle jedinečné varianty. Varianty mohou mít v každém jednotlivém grafu jinou barvu.) na straně 69* vykreslují korelaci VAF mezi dvěma přístroji pro každý vzorek. Na základě silné korelace mezi přístrojem Přístroj NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx jsou výkonnostní charakteristiky související s preanalytickými faktory (např. extrakční metody nebo interferující látky) stanoveny jako použitelné pro oba přístroje. Další podrobnosti najdete v příbalovém letáku k Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Obrázek 15 Korelační grafy frekvencí variant (Body jsou barevně odlišeny podle jedinečné varianty. Varianty mohou mít v každém jednotlivém grafu jinou barvu.)



Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost Přístroj NovaSeq 6000Dx byla hodnocena pomocí vzorků genomu Platinum Genome a pomocí reprezentativního rozboru navrženého k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází napříč 23 lidskými chromozomy s použitím 9 232 cílových oligonukleotidů. Celkem bylo hodnoceno 1723 cílených malých variant (SNV, inzerce a delece). Germinální testování sestávalo ze tří nebo čtyř replikátů dvanácti jedinečných vzorků genomu Platinum. Somatické testování sestávalo z pěti nebo šesti replikátů osmi jedinečných vzorků genomu Platinum Genome zpracovaných pomocí FFPE při různých úrovních VAF. Knihovny vzorků byly připraveny pomocí reagentů sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Testování bylo provedeno na třech externích pracovištích s použitím jedné šarže Sada reagentů NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklů) a jedné šarže Sada reagentů NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklů). Na každém pracovišti byl použit jeden přístroj Přístroj NovaSeq 6000Dx. Testování na každém pracovišti prováděli dva operátoři. Každý operátor provedl testování ve třech počátečních dnech, které nenásledovaly po sobě, pro každý typ vzorku, celkem tedy 36 průtokových kyvet na třech pracovištích. Pro každý počáteční den byly knihovny germinálních vzorků sekvenovány na straně A přístroje pomocí reagentů S2 a pracovního postupu analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a knihovny somatických vzorků byly sekvenovány na straně B přístroje pomocí reagentů S4 a pracovního postupu analýzy generace Somatic FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Výsledkem tohoto testování bylo 18 průtokových kyvet pro každý germinální a somatický pracovní postup.

Germinální

U germinálních běhů jsou místa genomu, kde je detekována cílová germinální varianta, hlášena jako pozitivní (varianta). U očekávaných pozitivních germinálních variant byly údaje hodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procento pozitivních přiřazení (PPC) v rámci každého typu varianty (SNV, Inzerce, delece).

Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty na straně 70 shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 31 Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná pozitivní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Inzerce	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Delece	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Pozitivní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde je detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Místa genomu, kde není detekována cílová varianta, jsou hlášena jako negativní (divoký typ). U očekávaných negativních míst byly údaje vyhodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procenta negativních přiřazení (PNC). *Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných negativních výsledků na straně 70* shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Tabulka 32 Pozorování germinálních přiřazení u očekávaných negativních výsledků

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná negativní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Divoký typ	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Negativní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde není detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Somatická

U somatických běhů jsou místa genomu, kde je detekována cílová somatická varianta, hlášena jako pozitivní (varianta). U očekávaných pozitivních somatických variant, kde je průměrná frekvence variantní alely (VAF) větší nebo rovna 14 % a menší nebo rovna 28 %, byly údaje hodnoceny pro míru bez přiřazení a procento pozitivních přiřazení (PPC) v rámci každého typu varianty (SNV, inzerce, delece). *Pozorování somatických přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty (střední hodnota VAF $\geq 14\%$ a $\leq 28\%$) na straně 71* shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 33 Pozorování somatických přiřazení u očekávaných pozitivních výsledků podle typu varianty (střední hodnota VAF $\geq 14\%$ a $\leq 28\%$)

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná pozitivní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PPC	95% LCL ³	95% UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Inzerce	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Delece	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Pozitivní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde je detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Místa genomu, kde není detekována cílená somatická varianta, jsou hlášena jako negativní (divoký typ). U očekávaných negativních míst byly údaje vyhodnoceny z hlediska míry variant bez přiřazení a procenta negativních přiřazení. [Pozorování somatických přiřazení u očekávaných negativních výsledků na straně 71](#) shrnuje pozorované míry spolu s dolní a horní 95% hladinou spolehlivosti (LCL/UCL) vypočítané metodou Wilsonova skóre pro každý typ varianty.

Tabulka 34 Pozorování somatických přiřazení u očekávaných negativních výsledků

Typ varianty	Pozorované bez přiřazení ¹	Přiřazení celkem	Procento bez přiřazení	Pozorovaná negativní přiřazení ²	Celkem hodnotitelných přiřazení	PNC	95% LCL ³	95% UCL
Divoký typ	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ Pojem bez přiřazení se definuje jako cílová chromozomální pozice, kde nelze stanovit variantu (z důvodu malé hloubky pokrytí).

² Negativní přiřazení jsou definována jako cílené chromozomální pozice, kde není detekována varianta.

³ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti vypočítané metodou Wilsonova skóre.

Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 200025276 v01	Září 2022	Aktualizovaná data přesnosti pro pozorování germinálních přiřazení.
Dokument č. 200025276 v00	Srpen 2022	První vydání.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYŇŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŤ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POUŽÍVÁNÍ KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

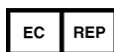
© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejích příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách naleznete na adrese www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australský sponzor

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

Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které jsou uvedeny na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) pro vaši sadu.