

Pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN
VAIN VIENTIÄ VARTEN

Suunniteltu käyttötarkoitus

NovaSeq 6000Dx -laite on tarkoitettu DNA-kirjastojen sekvensointiin, kun sitä käytetään *in vitro*-diagnostisten (IVD) määritysten kanssa. NovaSeq 6000Dx -laite on tarkoitettu käyttöön tiettyjen rekisteröityjen, sertifioitujen tai hyväksytyjen IVD-reagenssien ja analyysiohjelmiston kanssa.

Menetelmän periaatteet

illumina® NovaSeq 6000Dx -laite on tarkoitettu DNA-kirjastojen sekvensointiin *in vitro*-diagnostisilla määrityksillä. Syöttöä varten NovaSeq 6000Dx käyttää DNA:sta luotuja kirjastoja, joihin näyteindeksit ja kaappaussekvenssit lisätään vahvistettuihin kohteisiin. Näytekirjastot kaapataan virtauskyvettiin ja sekvensoidaan instrumenttiin synteessin (SBS-kemian) avulla. SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää fluoresoivasti merkittyjen yksittäisten nukleotidipohjien toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-säikeisiin. Real-Time Analysis (reaaliaikainen analyysi, RTA) on ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatupisteytyksen kullekin emäkselle kussakin sekvensointijaksossa. Kun ensisijainen analyysi päättyy, toissijainen analyysi voidaan suorittaa mukana toimitetulla ja tarvittavalla illumina DRAGEN-palvelin NovaSeq 6000Dx -laitteelle -palvelimella emästunnistusten prosessoimiseksi. NovaSeq 6000Dx käyttää erilaisia toissijaisen analyysin sovelluksia työnkulun mukaisesti. DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksessa prosessointi sisältää demultipleksoinnin, FASTQ-tiedoston luonnin, kohdistuksen, variantin tunnistuksen sekä variantin tunnistusformaatin (VCF ja gVCF) tiedostojen luomisen. VCF- ja gVCF-tiedostot sisältävät tietoa joko ituradan tai somaattisista varianteista (valitun työnkulun mukaisesti), jotka havaittiin viitegenomin tietyistä asemista.

Käytön kaksoistila

NovaSeq 6000Dx sisältää yhden käynnistyksen kiintolevyn, jossa on erilliset *in vitro*-diagnostiikan (IVD) ja pelkän tutkimuskäytön (RUO) tilat. Tila valitaan Sequencing (Sekvensointi) -näytössä olevalla vaihtopainikkeella. Valittu tila on selvästi merkitty liittymään kaikilla näytöillä. IVD-sekvensointimääritykset, myös DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus joko ituradan ja/tai somaattisissa työkuluissa, suoritetaan IVD-tilassa. IVD-tilassa voidaan käyttää vain IVD-sekvensointireagensseja. Menetelmän suorituskykyominaisuudet ja rajoitukset NovaSeq 6000Dx:n osalta on määritetty käyttäen DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta IVD-tilassa.

Menetelmän rajoitukset

1. Vain *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.
2. DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus voi yhdessä NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) ja NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssien kanssa käytettynä antaa seuraavat asiat:
 - Sekvensoinnin tulos:
 - ≥ 1.0 teraemästä (TB) S2-pakkauksella
 - ≥ 3.0 TB S4-pakkauksella
 - Lukupituus (paired end -ajossa) 2 x 150 emäsparia (bp).
 - Yli Q30 ≥ 85 %:n emäkset lukupituudella 2 x 150 bp. Vähintään 85 %:llä emästunnistuksia on Phred-asteikon laatuasteikot ≥ 30 , mikä osoittaa yli 99,9 %:n emästunnistustarkkuutta.
3. Insertioita, joiden pituus > 18 bp, ja deleetioita, joiden pituus > 21 bp, ei ole validoitu.
4. Suuret variantit, muun muassa moninukleotidivariantit (MNV:t) ja suuret indelit, voidaan ilmoittaa erillisinä pienempinä variantteina VCF-tuotostiedostossa.
5. Pienet MNV:t ilmoitetaan erillisinä variantteina tulos-VCF-tiedostoissa.
6. Deleetioista ilmoitetaan VCF-tiedostossa VCF-formaatin edellisen emäksen koordinaateissa. Näin ollen ota huomioon viereiset variantit ennen kuin ilmoitat yksittäisen emästunnistuksen homotsygoottiseksi viitteeksi.
7. Ituratakohtaiset rajoitukset:
 - NovaSeq 6000Dx, joka käyttää DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua, on suunniteltu antamaan kvalitatiivisia tuloksia ituratavariantin tunnistusta varten (esim. homotsygoottinen, heterotsygoottinen, wild-tyyppinen).
 - Jäljennösmäärien variaatio saattaa vaikuttaa siihen, tunnistetaanko variantti homotsygoottiseksi vai heterotsygoottiseksi.
 - Järjestelmä ei raportoi useampaa kuin kaksi varianttia yhdessä sijainnissa, vaikka kopiolukuvariaatiota esiintyisikin.
8. Somaattis-spesifiset rajoitukset:
 - NovaSeq 6000Dx, joka käyttää DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua on suunniteltu antamaan kvalitatiivisia tuloksia somaattisen variantin tunnistusta varten (ts. somaattisen variantin esiintyminen).
 - Somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulku ei voi erotella iturata- ja somaattisten varianttien välillä. Kyseinen työnkulku on suunniteltu havaitsemaan variantteja erilaisilla varianttitiheyksillä, mutta varianttitiheyttä ei voi käyttää erottelemaan somaattisia variantteja ituratavarianteista.

- Näytteessä oleva normaali kudosisäilyys vaikuttaa varianttien toteamiseen. Ilmoitettu toteamisraja perustuu varianttitaajuuteen suhteessa sekä tuumorista että normaalista kudoksesta poimittuun kokonais-DNA:han.
- Jos samassa sijainnissa tunnistetaan useampi kuin yksi varianttialleeli, mitään alleeleista ei raportoida läpäisevinä variantteina. Sen sijaan koko alleelien sarja raportoidaan, mutta suodatetaan monialleelisen tunnisteen kautta.

Laadunvarmistusmenetelmät

NovaSeq 6000Dx -ohjelmisto arvioi kunkin ajon, näytteen ja emäksen tunnistuksen laadunvarmistusmittareita vastaan. Positiivisia ja negatiivisia kontroleja suositellaan myös kirjaston valmistuksessa, ja ne tulisi arvioida. Arvioi kontrollit seuraavasti.

- Negatiivinen kontrolli (ei mallikontrollia) tai toinen negatiivinen kontrolli – Tuloksen oltava odotettu. Jos negatiivinen kontrolli tuottaa odotetusta poikkeavan tuloksen, on mahdollisesti tapahtunut virhe näytteseurannassa, virheellinen indeksointialukkeiden rekisteröinti tai kontaminaatio.
- Positiivinen kontrollinäyte – Tuloksen oltava odotettu. Jos positiivinen kontrolli tuottaa odotetusta poikkeavan tuloksen, on mahdollisesti tapahtunut virhe näytteseurannassa tai virheellinen indeksointialukkeiden rekisteröinti.

Tuotteen osat

illumina NovaSeq 6000Dx koostuu seuraavista:

1. NovaSeq 6000Dx -laite (Luettelonro 20068232)
2. Ohjelmistokomponentit NovaSeq 6000Dx -laitteelle sisältävät seuraavat:

Ohjelmistosovellus	Asennussijainti	Toiminto	Kuvaus
NovaSeq-käyttöohjelmisto	NovaSeq 6000Dx	Ohjaa laitteen toimintaa	NovaSeq-käyttöohjelmisto (NVOS) hallinnoi laitteen käyttöä sekvensoinnin aikana ja tuottaa kuvia Real-Time Analysis (reaaliaikainen analyysi, RTA) -ohjelmiston käyttöön.
Real-Time Analysis -ohjelmisto (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Tuottaa ensisijaista analyysia	RTA-ohjelmisto muuntaa kuvat, jotka NVOS tuottaa kullekin ruudulle sekvensointiajon jaksoa kohti, emästen tunnistustiedostoihin. Emästen tunnistustiedostot ovat syötteitä illumina DRAGEN-palvelin NovaSeq 6000Dx -laitteellen sovellusmoduuleille. RTA-ohjelmistosovellus ei sisällä käyttöliittymää.

Ohjelmistosovellus	Asennussijainti	Toiminto	Kuvaus
illumina-ajon hallintaohjelma	illumina DRAGEN - palvelin	Ohjaa ajon käyttöönottoa ja hallintaa	illumina-ajon hallintaohjelma mahdollistaa käyttäjä- ja laitehallinnan, isännöi sovellusohjelmistoa ja mahdollistaa DRAGEN-laitteiston tehostamat genomiikan toissijaisen analyysin moduulit.

Käyttöolosuhteet

Katso lisätietoja käyttöolosuhteista *NovaSeq 6000Dx -laitteen tuotedokumentaatio* -ohjeen Ympäristökysymykset-osiosta.

Elementti	Määrittäminen
Lämpötila	Ylläpidettävä laboratorion lämpötila 19–25 °C (22 °C ±3 °C). Tämä lämpötila on laitteen käyttölämpötila. Ajon aikana ympäristön lämpötila ei saa vaihdella yli ±2 °C.
Kosteus	Tiivistymättömän suhteellisen kosteuden on pysyttävä välillä 20–80 %. Järjestelmää on käytettävä enintään 2000 metrin käyttökorkeudessa merenpinnasta.

Tarvikkeet ja laitteet

Tässä osiossa luetellaan kaikki NovaSeq 6000Dx -sekvensointiajoon tarvittavat välineet. Tämä käsittää illumina toimittamat tarvikkeet sekä lisätarvikkeet ja laitteet, jotka on hankittava muilta toimittajilta. Nämä tarvikkeet tarvitaan protokollan saattamiseen päätökseen sekä huolto- ja vianmääritysmenettelyiden toteuttamiseen.

Ks. tiedot tarvikkeissa tai tarvikkepakkauksessa olevista symboleista: [illumina IVD -symbolien selitys \(asiakirja nro 1000000039141\)](#).

Sekvensointitarvikkeet

NovaSeq 6000Dx -ajo edellyttää seuraavia osia:

- Puskurikasetti
- Klusterikasetti
- Virtauskyvetti
- Kirjastoputki
- SBS-kyvetti

NovaSeq 6000Dx -tarvikkeet on pakattu seuraaviin kokoonpanoihin. Jokaisessa osassa käytetään radiotaajuustunnistetta (RFID) tarvikkeiden tarkkaa jäljittämistä ja yhteensopivuutta varten.

Taulukko 1 Illumina:n toimittamat tarvikkeet

Pakkauksen nimi	Sisältö	Illumina-luettelonumero
NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)	S2-klusterikasetti S2-virtauskyvetti S2 SBS -kasetti	20046931
NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)	S4-klusterikasetti S4-virtauskyvetti S4 SBS -kasetti	20046933
NovaSeq 6000Dx S2 -puskurikasetti	S2-puskurikasetti	20062292
NovaSeq 6000Dx S4 -puskurikasetti	S4-puskurikasetti	20062293
NovaSeq 6000Dx -kirjastoputki	Yksi kirjastoputki	20062290
NovaSeq 6000Dx -kirjastoputki, 24:n pakkaus	24 kirjastoputkea	20062291

Kun vastaanotat tarvikkeet, varastoi tarvikkeet viipymättä ilmoitettuun lämpötilaan oikean suorituskyvyn varmistamiseksi.

Taulukko 2 NovaSeq 6000Dx -pakkauksen varastointi

Tarvike	Määrä	Säilytyslämpötila	Pituus	Leveys	Korkeus
Virtauskyvetti	1	2–8 °C	27,7 cm (10,9 tuumaa)	17 cm (6,7 tuumaa)	3,8 cm (1,5 tuumaa)
Klusterikasetti	1	–25...–15 °C	29,5 cm (11,6 tuumaa)	13 cm (5,1 tuumaa)	9,4 cm (3,7 tuumaa)
SBS-kyvetti	1	–25...–15 °C	30 cm (11,8 tuumaa)	12,4 cm (4,9 tuumaa)	11,2 cm (4,4 tuumaa)
Puskurikasetti	1	15–30 °C	42,2 cm (16,6 tuumaa)	20,6 cm (8,1 tuumaa)	21,1 cm (8,3 tuumaa)
Kirjastoputki	1	15–30 °C	4,1 cm (1,6 tuumaa)	2,3 cm (0,9 tuumaa)	12,4 cm (4,9 tuumaa)

Tarvikkeiden tiedot

Jotta tunnistetaan yhteensopivat pakkauksen osat, virtauskyvetit ja kasetit on merkitty symboleilla, jotka osoittavat pakkaustilan.

Taulukko 3 Yhteensopivuuden merkinnät

Pakkaustila	Tunnuksen merkintä	Kuvaus
S2-pakkauksen osat	S2	S2-virtauskyvetti tuottaa enintään 4,1 miljardia suodattimen läpäisevää yksittäistä lukua tuotoksen ollessa enintään 1000 Gb luettaessa 2 x 150 bp. S2-virtauskyvetti tuottaa nopean sekvensoinnin useimpiin korkean kapasiteetin sovelluksiin.
S4-pakkauksen osat	S4	S4-virtauskyvetti tuottaa enintään 10 miljardia suodattimen läpäisevää yksittäistä lukua tuotoksen ollessa enintään 3000 Gb luettaessa 2 x 150 bp. S4-virtauskyvetti on virtauskyvetin neljäkaistainen versio, joka on suunniteltu maksimaalista tuotosta varten.

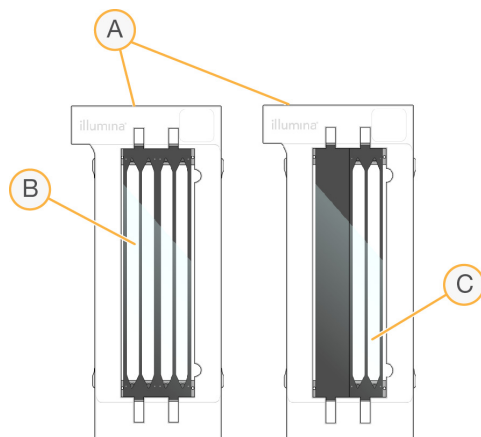
Virtauskyvetti

NovaSeq 6000Dx -virtauskyvetti on kasettiin suljettu kuviollinen virtauskyvetti. Virtauskyvetti on lasipohjainen substraatti, joka sisältää miljardeja nanokaivoja järjestetyssä järjestyksessä. Klustereita luodaan nanokaivoihin, joista sitten tehdään sekvensointi.

Jokaisessa virtauskyvetissä on useita kaistoja poolattujen kirjastojen sekvensointia varten. S2-virtauskyvetissä on kaksi kaistaa ja S4-virtauskyvetissä on neljä. Jokainen kaista kuvataan monina pyyhkäisyalueina, ja ohjelmisto jakaa sitten kunkin pyyhkäisyalueen kuvan pienempiin osioihin, joita kutsutaan ruuduiksi.

Muutamit naarmut ja muut kosmeettiset puutteet virtauskyvetissä ovat normaaleja, eikä niiden odoteta huonontavan tietojen laatua ja saantoa. Illumina suosittelee näiden virtauskyvettien käyttämistä normaaliin tapaan.

Kuva 1 Virtauskyvetit



- A. Virtauskyvettikasetti
- B. Neljäkaistainen virtauskyvetti (S4)
- C. Kaksikaistainen virtauskyvetti (S2)

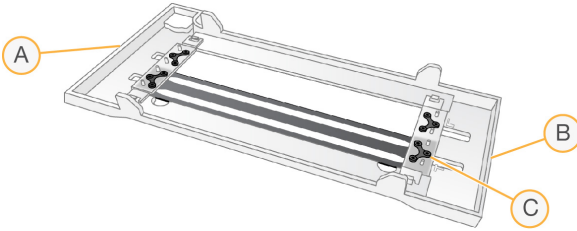
Kunkin virtauskyvetin pohjassa on useita tiivisteitä. Kirjastot ja reagenssit kulkevat virtauskyvetin kaistoihin tiivisteiden läpi virtauskyvetin tulopäässä. Käytetyt reagenssit poistetaan kaistoista lähtöpään tiivisteiden läpi.



HUOMIO

Vältä tiivisteiden koskettamista, kun käsittelet virtauskyvettä.

Kuva 2 Käännetty virtauskyvetti



- A. Lähtöpää
- B. Tulopää
- C. Tiiviste (yksi neljästä)

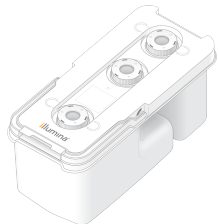
Puskuri-, klusteri- ja SBS-kasetin tiedot



NovaSeq 6000Dx:n puskuri-, klusteri- ja SBS-kaseteissa on foliolla suljetut säiliöt, jotka on täytetty valmiiksi reagensseilla, puskureilla ja pesuliuksella. Klusteri- ja SBS-kasetit sisältyvät NovaSeq 6000Dx - reagenssipakkauksiin. Puskurikasetti myydään erikseen.

Kasetit latautuvat suoraan laitteeseen, ja ne on värikoodattu ja merkitty latausvirheiden vähentämiseksi. Reagenssijäähdyttimen ja puskurilaatikon ohjaimet varmistavat oikean suunnan.

Taulukko 4 NovaSeq 6000Dx -kasetit

Tarvike	Kuvaus
Puskurikasetti	Esitäytetty sekvensointipuskureilla, painaa enintään 6,8 kg (15 paunaa). Muovikahva helpottaa kantamista, lataamista ja purkamista.
	Puskurikasetti sisältää reagensseja, jotka ovat arkoja valolle. Pidä puskurisäiliö pakkauksessaan käyttöön asti.

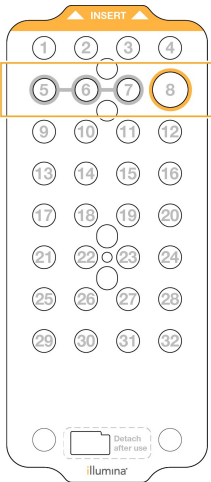


Tarvike	Kuvaus
 <p>Klusterikasetti</p>	<p>Esitäytetty klusterointi-, indeksointi- ja paired-end-reagensseilla sekä pesuliuksella. Sisältää kirjastoputkelle varatun aseman. Oranssit merkinnät erottavat klusterikasetin SBS-kasetista.</p> <p>Aseman nro 30 denaturointireagenssi sisältää formamidia, joka on orgaaninen happo ja myrkyllistä lisääntymiselimille. Jotta minkä tahansa käyttämättömän reagenssin hävittäminen olisi turvallista sekvensointiajon jälkeen, tämä säiliö on irrotettava.</p>
 <p>SBS -kasetti</p>	<p>Esitäytetty sekvensointireagensseilla tilavuuksina, jotka ovat pakkauksen tukeman jaksomäärän mukaisia. Jokaisella kolmesta reagenssiasemasta on viereinen asema, joka on varattu automaattista ajonjälkeistä pesua varten. Harmaat merkinnät erottavat SBS -kasetin klusterikasetista.</p> <p>SBS-kasetti sisältää reagensseja, jotka ovat arkoja valolle. Pidä SBS-säiliö pakkauksessaan käyttöön asti.</p>

Klusterikasetin varatut säiliöt

Kolme säiliötä on varattu tavallisille alukkeille ja tyhjä asema on varattu kirjastoputkelle. Näytteen jäljitettävyyttä varten kirjastoputki ladataan klusterikasettiin ajon käyttöönoton aikana, ja se pysyy kasetin kanssa ajon loppuun asti.

Kuva 3 Numeroidut säiliöt



Taulukko 5 Klusterikasettisäiliöt

Sijainti	Varattu tätä varten
5, 6 ja 7	Valinnaiset tavalliset alukkeet
8	Kirjastoputki

Käyttäjän hankittaviksi jäävät tarvikkeet ja laitteet

Taulukko 6 Tarvikkeet

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
Sentrifugipullo, 500 ml	Yleinen laboratoriotoimittaja	Tween 20 -polysorbaatin laimentamiseen huoltopesua varten.
Sentrifugiputki, 30 ml	Yleinen laboratoriotoimittaja	NaOCl:n laimentamiseen huoltopesua varten.
Kertakäyttökäsineet, puuterittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja	Yleiskäyttöön
Isopropanoliliinat, 70 % tai Etanolipyyhkeet, 70 %	VWR, luettelonro 95041- 714 tai vastaava Yleinen laboratoriotoimittaja	Puhdistusosia ennen ajoa ja yleistarkoituksiin.
Laboratorioliina, vähän nukkaava	VWR, luettelonro 21905- 026 tai vastaava	Virtauskyvetin tason kuivaamiseen ja yleistarkoituksiin.
Reagenssilaatuinen NaOCl, 5 %	Sigma-Aldrich, luettelonro 239305	Huoltopesun tekemiseen.
Pipettikärjet, 2 µl	Yleinen laboratoriotoimittaja	Pipetointi kirjastojen laimentamiseen ja lataamiseen.
Pipettikärjet, 20 µl	Yleinen laboratoriotoimittaja	Pipetointi kirjastojen laimentamiseen ja lataamiseen.
Pipettikärjet, 200 µl	Yleinen laboratoriotoimittaja	Pipetointi kirjastojen laimentamiseen ja lataamiseen.
Pipettikärjet, 1000 µl	Yleinen laboratoriotoimittaja	Pipetointi kirjastojen laimentamiseen ja lataamiseen.
Reagenssi- tai spektrofotometrilaausta isopropanolia (99 %), 100 ml:n pullo	Yleinen laboratoriotoimittaja	Optisten osien säännölliseen puhdistamiseen ja objektiivin puhdistuskasetin tukemiseen.
Tween 20	Sigma-Aldrich, tuotenro P7949	Huoltopesun tekemiseen.
Vesi, laboratoriokäyttöön tarkoitettu	Yleinen laboratoriotoimittaja	Tween 20 -polysorbaatin ja natriumhypokloriitin laimentamiseen huoltopesua varten.

Taulukko 7 Laitteet

Tuote	Toimittaja
Pakastin, -25...-15 °C	Yleinen laboratoriotuottaja
Asteikollinen sylinteri, 500 ml, steriili	Yleinen laboratoriotuottaja
Jääastia	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetti, 20 µl	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetti, 200 µl	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetti, 1000 µl	Yleinen laboratoriotuottaja
Jääkaappi, 2-8 °C	Yleinen laboratoriotuottaja
Allas, vesihauheet*	Yleinen laboratoriotuottaja

* Käytä allasta, johon mahtuu kaksi reagenssikasettia ja riittävä vesimäärä. Esimerkiksi 61 × 91,4 × 25,4 cm (24 × 36 × 10 tuumaa).

Laboratoriokäyttöön tarkoitettua vettä koskevat ohjeet

Käytä laitteen toimenpiteissä aina laboratoriokäyttöön tarkoitettua vettä. Älä koskaan käytä vesijohtovettä.

Käytä vain seuraavia vesiä tai vastaavia:

- deionisoitu vesi
- Illumina PW1 -vesi
- 18 megaohmin (MΩ) vettä
- Milli-Q-vesi
- Super-Q-vesi
- molekyylibiologiaan tarkoitettua vettä

Käyttöohjeet

Seuraavat ohjeet ovat NovaSeq 6000Dx -laitteen ajamiselle käytön IVD-tilassa joko S2- tai S4-pakkauskoonpanoja käyttäen.

Sekvensointiajon luominen

Noudata seuraavia vaiheita ajon luomiseen käyttäen Illumina-ajon hallintaohjelmaa joko IVD- tai RUO-tilassa. Valitse vaihtoehtoisesti Runs (Ajot) -sivun Planned (Suunniteltu) -välilehden kohta **Import Run** (Tuo ajo) ja tuo jokin näytetiedosto. Luo uusia ajoja joko laitteessa tai siirtymällä Illumina-ajon hallintaohjelmaan käyttämällä selainta verkkotietokoneessa.

HUOMAUTUS Tarkat kunkin analyysisovelluksen tarvitsemat tiedot vaihtelevat, mutta prosessi ajon luomiseksi käsittää seuraavat vaiheet.

1. Valitse Runs (Ajot) -näytön Planned (Suunnitellut) -välilehdeltä **Create Run** (Luo ajo).
2. Valitse jokin sovellus ja sitten **Next** (Seuraava).
3. Jatka asetusnäyttöjen läpi. Sovelluksen mukaan esitetyt näytöt voivat sisältää seuraavia:
 - **Run Settings** (Ajon asetukset) – Anna ajoparametrit.
 - **Sample Data** (Näytetiedot) – Anna näytetiedot manuaalisesti tai tuomalla CSV-tiedosto, joka sisältää näytetiedot. Näytenimien on oltava yksilöllisiä.
 - **Analysis settings** (Analyysin asetukset) – Anna asetukset analyysiä varten.
4. Tarkastele ajotietoja Review (Tarkastele) -näytöllä ja valitse **Save** (Tallenna). Ajo lisätään ajoluettelon yläosaan Planned (Suunniteltu) -välilehdellä.

Tarvikkeiden valmisteleminen

SBS- ja klusterikasettien sulattaminen

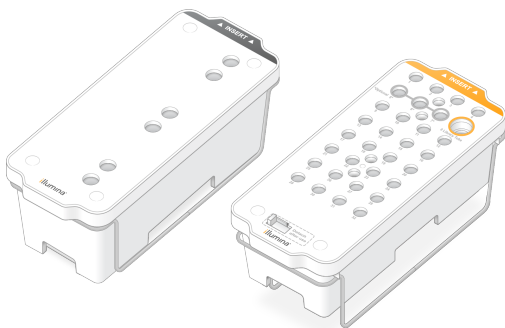


HUOMIO

Kuuman veden käyttäminen reagenssien sulatukseen voi johtaa tietojen huonontuneeseen laatuun tai ajon epäonnistumiseen.

1. Jos sekvensointiajo on käynnissä, varmista, että laitteen molemmat puolet ovat käytettävissä, kun sulatus on päättynyt.
2. Ota SBS- ja klusterikasetit $-25...-15$ °C:n säilytyspaikasta.
3. Aseta kukin kasetti lankasulatustelineeseen.
Telineet toimitetaan yhdessä laitteen kanssa, ja ne estävät kaatumisen vesihauteessa.

Kuva 4 Kasetit lankasulatustelineissä



4. Määritä sulatuksen kesto seuraavaa taulukkoa käyttäen.

Sulata SBS- ja klusterikasetit huoneenlämpöisessä (19–25 °C) vesihauteessa seuraavasti. Upota kasetit noin puoleenväliin.

Kasetti	Sulatuksen kesto
S2 SBS -kasetti	4 tuntia
S2-klusterikasetti	Enintään 2 tuntia
S4 SBS -kasetti	4 tuntia
S4-klusterikasetti	Enintään 4 tuntia



HUOMIO

Jos sekvensointia ei voida aloittaa neljän tunnin kuluessa sulatuksesta, reagenssikasetit voivat johtaa tietojen laadun huononemiseen.

5. Kuivaa kasettipohjat perusteellisesti paperiliinoilla. Kuivaa kuoppien välistä niin, että kaikki vesi poistuu.
6. Tarkista, ettei foliostiivisteissä ole vettä. Jos vettä on, kuivaa nukkaamattomalla liinalla.
7. Tarkista kunkin kasetin pohja sen varmistamiseksi, että säiliöissä ei ole jäätä, mikä osoittaa, että reagenssit ovat sulaneet.
8. Käännä jokaista kasettia 10 kertaa reagenssien sekoittamiseksi.



HUOMIO

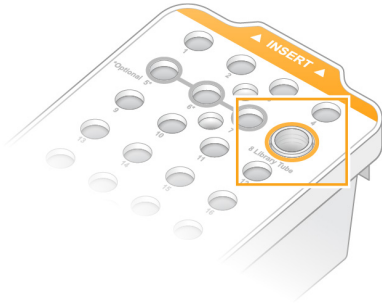
Jos kasetteja ei käännellä perusteellisesti, seurauksena voi olla tietojen laadun huononeminen.

9. Napauta kunkin kasetin pohjaa varovasti työtason päällä, jotta ilmakuplat vähenevät.

Kirjastoputken lataaminen

- Älä häiritse pohjassa olevaa kirjastoa. Aseta korkiton kirjastoputki, joka sisältää denaturoidun ja laimennetun kirjastopoolin, klusterikasetin **Library Tube** (Kirjastoputki) -asemaan (nro 8).
- Aseta kirjastoputki klusterikasetin asemaan nro 8.

Kuva 5 Korkiton kirjastoputki ladattuna asemaan nro 8

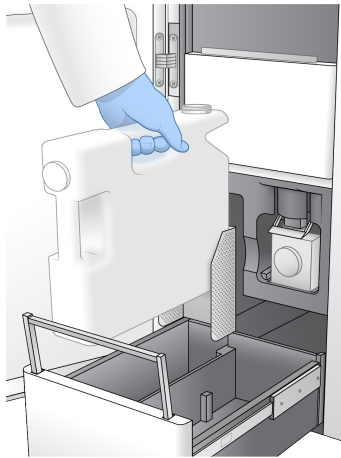


Tyhjät käytetyt reagenssipullot

Noudata seuraavia ohjeita käytettyjen reagenssipullojen tyhjentämiseksi *jokaisella* sekvensointiajolla. Jos järjestelmäsi on määritetty reitittämään käytetyt reagenssit ulkoisesti, pieni pullo kerää käytetyt reagenssit, ja se täytyy tyhjentää kutakin sekvensointiajota varten. Suuren pullon täytyy olla paikoillaan.

1. Irrota ja tyhjennä pieni käytettyjen reagenssien pullo seuraavasti.
 - a. Kohota vipua ja poista pieni käytettyjen reagenssien pullo syvennyksestä. Tartu pulloon sen kyljistä.
 - b. Poista kierrekorkki korkinpitimestä pullon etuosassa.
 - c. Sulje pullon suu korkilla läikkymisten estämiseksi.
 - d. Pidä sisältö erillään toisen pullon sisällöstä ja hävitä alueellasi sovellettavien standardien mukaisesti.
 - e. Palauta korkiton pullo syvennykseen ja laske sitten vipua. Säilytä korkki korkinpitimessä.
2. Irrota ja tyhjennä suuri käytettyjen reagenssien pullo seuraavasti.
 - a. Käytä yläosan kahvaa ja poista suuri käytettyjen reagenssien pullo puskurilaatikon vasemmalta puolelta.
 - b. Poista kierrekorkki korkinpitimestä pullon etuosassa.
 - c. Sulje pullon suu korkilla läikkymisten estämiseksi.
 - d. Hävitä sisältö alueellasi sovellettavien standardien mukaisesti. Tartu molempiin kädensijoihin tyhjentäessäsi.
 - e. Palauta korkiton pullo puskurilaatikkoon. Säilytä korkki korkinpitimessä.

Kuva 6 Tyhjän pullon palauttaminen



3. Pue uudet puuterittomat suojakäsineet.



HUOMIO

Käytä aina uutta käsineparia käytettyjen reagenssien pullon käsittelemisen jälkeen.

4. Sulje puskurilaatikko ja sulje sitten nestelokeron luukut.



HUOMIO

Jos käytettyjä reagenssipulloja ei tyhjenetä, ajo voi päättyä ja seurauksena voi olla ylivuoto, joka vaurioittaa laitetta ja muodostaa turvallisuusriskin.

Virtauskyvetin valmisteleminen

1. Ota uusi rasiallinen virtauskyvettipakkaus 2–8 °C:n säilytyslämpötilasta.
2. Aseta suljettu virtauskyvettipakkaus odottamaan ympäröivässä lämpötilassa (19–25 °C) 10–15 minuutin ajaksi.

Käytä virtauskyvetti 12 tunnin aikana siitä, kun se otettiin pakkauksesta.

Tarvikkeiden lataaminen

Noudata seuraavia ohjeita ajon käyttöönoton alkamiseksi ja tarvikkeiden lataamiseksi.

1. Valitse päävalikosta **Sequence** (Sekvensoi) ja valitse sitten yhden tai kahden virtauskyvetin ajo seuraavasti.
 - **A+B** – Aseta käyttöön kahden virtauskyvetin ajo.
 - **A** – Aseta käyttöön yhden virtauskyvetin ajo puolella A.
 - **B** – Aseta käyttöön yhden virtauskyvetin ajo puolella B.

Järjestelmä alustaa ajon käyttöönoton alkaen virtauskyvetin lataamisella.
2. Valitse **OK**, jolla kuittaa varoituksen, ja avaa virtauskyvetin luukku.

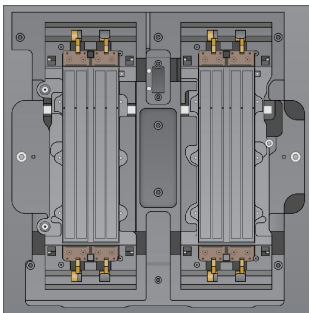
**HUOMIO**

Pidä pinta vapaana sekvensointiajon aikana ja vältä laitteeseen nojaamista. Virtauskyvetin luukkuun kohdistuva paine voi saada sen avautumaan, mikä pysäyttää ajon. Pysäytettyjä ajoja ei voida jatkaa.

Virtauskyvetin lataus

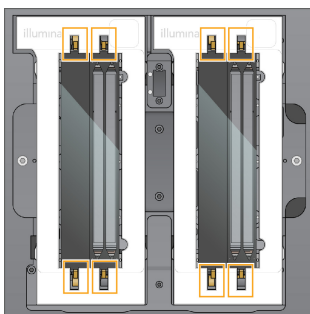
1. Jos edellisestä ajosta on jäänyt virtauskyvetti, poista se.
2. Jos virtauskyvetin tasolla on hiukkasia, puhdista koko taso alkoholipyyhkeellä, myös fluidistoriliitäntä ja optisen kohdistuksen kohde-elektrodin lasipinta. Kuivaa nukkaamattomalla liinalla.

Kuva 7 Virtauskyvettivaihe



3. Ota virtauskyvetti pakkauksesta seuraavasti.
 - a. Pue uusi talkiton käsinepari virtauskyvetin lasipinnan kontaminoitumisen välttämiseksi.
 - b. Pidä pakkausta tasaisella pinnalla ja repäise folio auki kulmakielekkeestä.
 - c. Irrota kirkas muovipidike, joka peittää virtauskyvetin.
 - d. Ota virtauskyvetti pakkauksesta. Tartu virtauskyvettiin sivuilta, jotta vältetään lasiin tai alapinnan tiivisteihin koskemiselta.
 - e. Jos hiukkasia on näkyvissä lasipintojen jommallakummalla puolella, puhdista kyseinen pinta nukkaamattomalla alkoholipyyhkeellä ja kuivaa vähänukkaisella laboratoriopyyhkeellä.
 - f. Hävitä pakkaus asianmukaisesti.
4. Kohdista virtauskyvetti neljään korotettuun pidikkeeseen ja aseta virtauskyvetti virtauskyvetin tasolle.

Kuva 8 Ladatut virtauskyvetit kohdistettuina pidikkeiden päälle



5. Valitse **Close Flow Cell Door** (Sulje virtauskyvetin luukku).
Virtauskyvetin luukku sulkeutuu, sensorit ja RFID tarkistetaan ja virtauskyvetin tunnus tulee näkyviin näyttöön.

SBS- ja klusterikasettien lataaminen

1. Avaa nestelokeron luukut ja avaa sitten reagenssijäähdyttimen luukku.
2. Poista käytetyt SBS- ja klusterikasetit edellisen ajon jäljiltä, jos niitä on.
Käytettyjen kasettien foliotiivisteet on lävistetty.
3. Hävitä käytetty sisältö määräysten mukaisesti.
Ks. aseman nro 30 klusterikasetin turvallinen hävittäminen: [Aseman nro 30 irrottaminen sivulla 20](#).
4. Lataa valmistellut kasetit reagenssijäähdyttimen laatikkoon seuraavasti, niin että Insert (Vie sisään) -merkinnät suuntautuvat laitteen takaosaa kohti.
 - Aseta SBS-kasetti (harmaa merkki) vasempaan asemaan.
 - Aseta klusterikasetti (oranssi merkki), joka sisältää korkittoman kirjastoputken, oikeaan asemaan.

Kuva 9 Ladatut reagenssikasetit

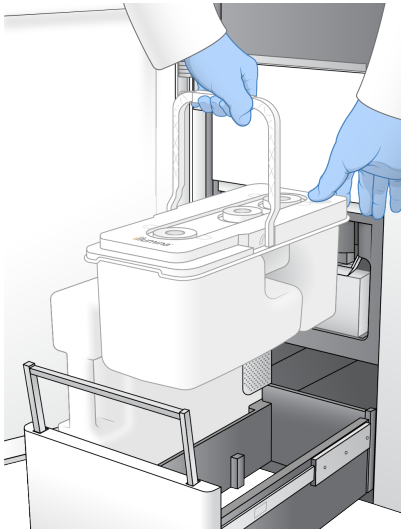


5. Työnnä laatikko jäähdyttimeen ja sulje sitten reagenssijäähdyttimen luukku.
Sensorit ja RFID:t tarkistetaan. Kirjastoputken ja kahden kasetin tunnisteen ilmestyvät näyttöön.

Puskurikasetin lataaminen

1. Vedä metallikahvaa avataksesi puskurilaatikon.
2. Poista käytetty puskurikasetti puskurilaatikon oikealta puolelta.
Käytetyn puskurikasetin foliotiivisteet on lävistetty.
3. Aseta uusi puskurikasetti puskurilaatikkoon siten, että Illumina-merkki kohdistuu laatikon etuosaan.
Kohdista kasetti laatikon pohjan ja sivujen korotettuihin ohjaimiin.
Kun puskurikasetti on ladattu oikein, se asettuu tasaisesti paikalleen ja laatikko voi sulkeutua.

Kuva 10 Puskurikasetin lataaminen



4. Jos molemmat käytetyt reagenssipullot ovat tyhjentyneet, valitse valintaruutu kuitaten, että molemmat reagenssipullot ovat tyhjä.

HUOMAUTUS Jos käytettyjä reagenssipulloja ei tyhjenetä, ajo voi päättyä ja seurauksena voi olla ylivuoto, joka vaurioittaa laitetta ja muodostaa turvallisuusriskin.

5. Kun tarvikkeet on lisätty, jatka valitsemalla **Run Selection** (Aja valinta).

Ajon valinta ja käynnistäminen

Laite skannaa kirjastoputken tunnuksen ja hakee sitä vastaavaa suunniteltua ajoa.

1. Jos kirjastoputken tunnusta vastaava suunniteltu ajo löydetään kumpaakin käytettävää puolta varten, ajon valinta ohitetaan. Jatka valitsemalla **Review** (Tarkastele).
2. Jos yhdelle tai molemmille puolille ei löydy vastaavaa ajoa, valitse **Run Selection** (Ajon valinta) ja valitse sitten yksi tai useampi suunniteltu ajo.
Samaa suunniteltua ajoa ei voi valita molemmille puolille.
3. Kun yksi tai useampi ajo on valittu, valitse **Pre-Run Checks** (Ajoa edeltävät tarkistukset).
4. Odota noin 5 minuuttia ajoa edeltävän tarkistuksen päättymistä.
Ajo käynnistyy automaattisesti, kun tarkistus suoritetaan onnistuneesti.

HUOMAUTUS Jotta kiintolevyn ylitäyttö vältetään, älä kopioi mitään tietoja C:\-asemalle sen jälkeen, kun ajo käynnistyy.

Ajoa edeltävän tarkistuksen virheet

1. Jos ajoa edeltävät tarkistukset epäonnistuvat sensorivirheen takia, kuten jos virtauskyvettä ei havaita, työnkulusta on poistuttava ja käynnistettävä se uudelleen.
2. Muiden ajoa edeltävän tarkistuksen epäonnistumisten osalta valitse **Retry** (Yritä uudelleen) epäonnistuneen tarkistuksen käynnistämiseksi uudelleen tai **Retry All** (Yritä kaikkia uudelleen) kaikkien tarkistuksien käynnistämiseksi uudelleen.
Virheet on selvitettävä ennen kuin ajo voi alkaa.
3. Valitsemalla **Error** (Virhekuvake) voit nähdä virheen tiedot.
4. Jos kohdistuksen tarkistus epäonnistuu, selvitä virhe seuraavasti.
 - a. Palaa Load (Lataa) -näyttöön valitsemalla **Reload** (Lataa uudelleen) ja valitse sitten **OK**.
 - b. Poista mahdolliset esineet laitteen yläosasta ja valitse sitten **OK**. Virtauskyvetin luukku avautuu.
 - c. Lataa virtauskyvetti uudelleen ja valitse sitten **Run Setup** (Aja käyttöönnotto).
 - d. Jatka kunkin näytön läpi jokaisen RFID-tunnisteen lukemiseksi uudestaan ja palaa Pre-Run Checks (Ajoa edeltävät tarkistukset) -näyttöön.
 - e. Tee tarkistus uudelleen.

Ajon edistymisnäyttö






Seuraavat tiedot näytetään Sequencing (Sekvensointi) -näytössä, kun ajo on käynnissä. Sekvensointinäyttöön päästään päävalikon kautta.

- **Yksittäisten ajovaiheiden tila**
- **Time to completion** (Aika päättymiseen) – Ajon päättymisen päivämäärä ja aika (vvvv-kk-pp hh:minmin).
- **Run progress** (Ajon eteneminen) – Nykyinen ajovaihe. Edistymispalkin koko ei ole verrannollinen kunkin vaiheen ajomäärään.
- **Q-Scores** (Q-pistemäärät) – Laatusuorituksen (Q-pistemäärien) jakautuminen.
- **Intensity** (Intensiteetti) – Klusterien intensiteettiarvo kunkin ruudun 90. prosenttipisteen kohdalla. Kuvaajan värit osoittavat punaisen ja vihreän kanavan.
- **Clusters Passing Filter (%)** (Suodattimen läpäisevät klusterit (%)) – Suodattimen läpäisevien klusterien prosenttiosuus.
- **Projected Total Yield (GB)** (Ennakoitu kokonaissaanto (GB)) – Virtauskyvettiajon ennakoitu saanto. Jos valitaan mittaustiedot kaistaa kohti (H), näytettävät numerot ovat tämänhetkinen saanto kaistaa kohti, ja ne päivittyvät jaksoa kohti koko ajon ajan.
- **Q30** – Emästunnistusten prosenttiosuus ajolle, jonka Q-pistemäärä on ≥ 30 .

Tilakuvakkeet

Tilakuvake NVOS-liittymässä osoittaa ajon tilaa. Kuvakkeessa näkyvä numero osoittaa tilakohtaisten olosuhteiden lukumäärän.

Kun ajon tila muuttuu, kuvake vilkkuu. Valitsemalla kuvakkeen voit tarkastella kuvausta tilanteesta. Poista viesti valitsemalla **Acknowledge** (Kuittaa) ja sulje sitten valintaikkuna valitsemalla **Close** (Sulje).

Tilakuvake	Tilan nimi	Kuvaus
	Tila OK	Järjestelmän tila on normaali.
	Prosessointi	Järjestelmässä on prosessointi käynnissä.
	Varoitus	On tapahtunut varoitus ja tarvitaan huomiota. Varoitukset eivät pysäytä ajoa tai edellytä toimia ennen jatkamista.
	Virhe	Järjestelmässä on tapahtunut virhe. Virheet edellyttävät toimia ennen ajon jatkamista.
	Tieto	Ei-kriittinen viesti on saatavilla.

Ajon mittaustiedot

Ohjelmisto näyttää ajon aikana tuotetut mittaustiedot. Mittaustiedot esitetään piirroksina, kaavioina ja taulukkoina, jotka perustuvat RTA3:n luomiin tietoihin ja jotka on kirjoitettu InterOp-tiedostoihin.

Klusterointi kestää noin 2 tuntia, jonka jälkeen sekvensointi alkaa jaksosta 1. Mittaustiedot päivittyvät sekvenssoinnin edetessä. Suodattimen läpäisevät klusterit, saanto ja laatuasteet ovat käytettävissä jakson 26 jälkeen. Ennen jaksoa 26 mitään arvoja ei tule näkyviin, ja ne on nimetty merkinnällä Ei sovellu.

Sekvenssoinnin jälkeen

Seuraavissa osioissa annetaan ohjeet vaiheista, jotka tapahtuvat, kun sekvensointi on päättynyt.

Automaattinen ajonjälkeinen pesu

Kun sekvensointi on päättynyt, ohjelmisto aloittaa automaattisen ajonjälkeisen pesun, joka kestää noin 80 minuuttia. Järjestelmä pumppaa 0,24-prosenttista natriumhypokloriittia (NaOCl) asemasta nro 17 ja laimentaa sen 0,12-prosenttiseksi. 0,12-prosenttista NaOCl:a pumpataan ExAmp-reagenssin ja kirjaston asemiin, virtauskyvetin läpi ja sitten käytettyjen reagenssien pulloon. Pesu huuhtelee mallin järjestelmästä

ristikontaminaation ehkäisemiseksi.

Kun pesu on valmis, järjestelmä asetetaan turvalliseen tilaan ja Home-painike muuttuu aktiiviseksi. Jätä tarvikkeet paikalleen seuraavaan ajoon asti. Pesun jälkeen annostelijat jäävät SBS- ja klusterikasetteihin, jotta järjestelmään ei pääse ilmaa. Annostelijat puskurikasetissa nostetaan, jotta käytettyjen reagenssien pullot voidaan tyhjentää. Sitten pesupuskuria pumpataan kaikkien letkujen läpi NaOCl:n ja reagenssien puhdistamiseksi pois järjestelmästä.

HUOMAUTUS Jos automaattisen ajonjälkeisen pesun aikana tapahtuu virhe ja ajonjälkeinen pesu on epätäydellinen, tarvitaan huoltopesu.

Aseman nro 30 irrottaminen

Klusterikasetin asemassa nro 30 oleva säiliö sisältää formamidia. Se poistetaan käytetystä klusterikasetista ja hävitetään erikseen.



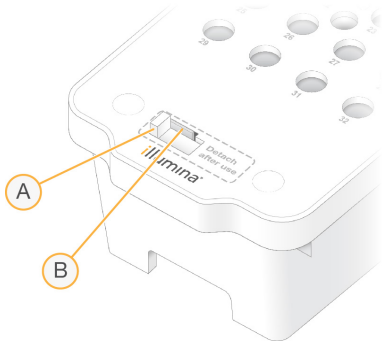
HUOMIO

Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

1. Käytä käsineitä ja työnnä valkoista muovikielekettä, jossa on merkintä **Detach after use** (Irrota käytön jälkeen), oikealle.
2. Aseta käsi tai kiinteä pinta säiliön alle ja paina kirkasta muovikielekettä Illumina -merkintää kohti, jotta voit vapauttaa säiliön klusterikasetin alta.

HUOMAUTUS Vältä klusterikasettien pinoamista säilytyksen aikana. Pinoaminen voisi aiheuttaa säiliön irtoamisen vahingossa.

Kuva 11 Irrotettava asema nro 30



- A. Valkoinen muovikieleke irrottamiseen
- B. Kirkas muovikieleke vapauttamiseen

3. Hävitä säiliö asianmukaisten määräysten mukaisesti.

Sekvensoinnin tulos

Sekvensoinnin aikana tiedot siirretään automaattisesti NovaSeq 6000Dx -laite -laitteesta Illumina DRAGEN -palvelin -palvelimeen. Kun ensisijainen analyysi päättyy ja tietojen siirto on saatu loppuun, toissijainen analyysi Illumina DRAGEN -palvelin -palvelimessa voi alkaa automaattisesti käyttäen analyysivaihtoehtoja, jotka Illumina-ajon hallintaohjelmaissa valittu sovellus määrittelee. Tuotetut tulokset määräytyvät ajon käyttöönoton aikana valittujen vaihtoehtojen mukaan. Jotta voit katsella ajosta saatuja tuloksia, valitse halutun ajon nimi Runs (Ajot) -näytön Completed (Päätyneet) -välilehdellä. Voit löytää tulostetiedostot myös Instrument Settings (Laitteasetukset) -näytössä nimetystä sijainnista.

Real-Time Analysis (Reaaliaikainen analyysi)

NovaSeq 6000Dx -laite käyttää RTA3:a, joka on Real-Time Analysis (Reaaliaikainen analyysi) -ohjelmiston toteutus, laitteen laskentamoottorissa (CE). RTA3 poimii intensiteetit kamerasta saaduista kuvista, tekee emästunnistuksen, nimeää laatu pistemäärän emästunnistuksille, kohdistaa PhiX-kirjastoon ja ilmoittaa tiedot InterOp-tiedostoissa.

Käsittelyajan optimoimiseksi RTA3 tallentaa tiedot muistiin. Jos RTA3 päätetään, käsittelyä ei jatketa ja mahdolliset muistissa käsitellyt ajotiedot menetetään.

RTA3-syötteen

RTA3 edellyttää paikalliseen järjestelmämuistiin sisältyviä ruutukuvia prosessointiin. RTA3 saa ajotiedot ja komennot NVOS:lta.

RTA3-tuotokset

Kunkin värikanavan kuvat siirretään RTA3:n muistiin ruutuina. RTA3 tuottaa tulosteena näistä kuvista joukon laatupisteytettyjen emästunnistusten tiedostoja ja suodatintiedostoja. Kaikki muut tulosteet ovat tukitiedostoja.

Tiedostotyyppi	Kuvaus
Emästen tunnistamistiedostot	Jokainen analysoitava ruutu sisällytetään ketjutettuun emäksen tunnistamistiedostoon (*.cbcl). Saman kaistan ja pinnan ruudut kootaan yhteen CBCL-tiedostoon kullekin kaistalle ja pinnalle.
Suodatintiedostot	Jokaisesta ruudusta luodaan suodatintiedosto (*.filter), joka määrittää, läpäiseekö klusteri suodattimet.

RTA3 antaa reaaliaikaiset mittaustiedot ajon laadusta tallennettuina InterOp-tiedostoina, jotka ovat binäärinen tuotos, joka sisältää ruutu-, jakso- ja lukutason mittaustiedot.

Virheiden käsittely

RTA3 luo lokitiedostot ja kirjoittaa ne Logs-kansioon. Virheet kirjataan tekstitiedostoon *.log-tiedostomuodossa.

Seuraavat lokitiedostot siirretään lopulliseen tulostuskohteeseen prosessin lopussa:

- `info_00000.log`-tiedostossa tiivistetään tärkeitä ajotapahtumia.
- `error_00000.log` sisältää luettelon ajon aikana tapahtuneista virheistä.
- `warning_00000.log` sisältää luettelon ajon aikana ilmoitetuista varoituksista.

Virtauskyvetin ruudut

Ruudut ovat pieniä kuvantamisalueita virtauskyvetissä. Kamera ottaa jokaisesta pyyhkäisyypinnasta yhden kuvan, jonka ohjelmisto jakaa ruutuihin RTA3-prosessointia varten. Ruutujen kokonaismäärä riippuu siitä, montako kaistaa, pyyhkäisyypintaa ja pintaa virtauskyvetistä kuvataan.

- S2-virtauskyveteissä on yhteensä 1408 ruutua.
- S4-virtauskyveteissä on yhteensä 3744 ruutua.

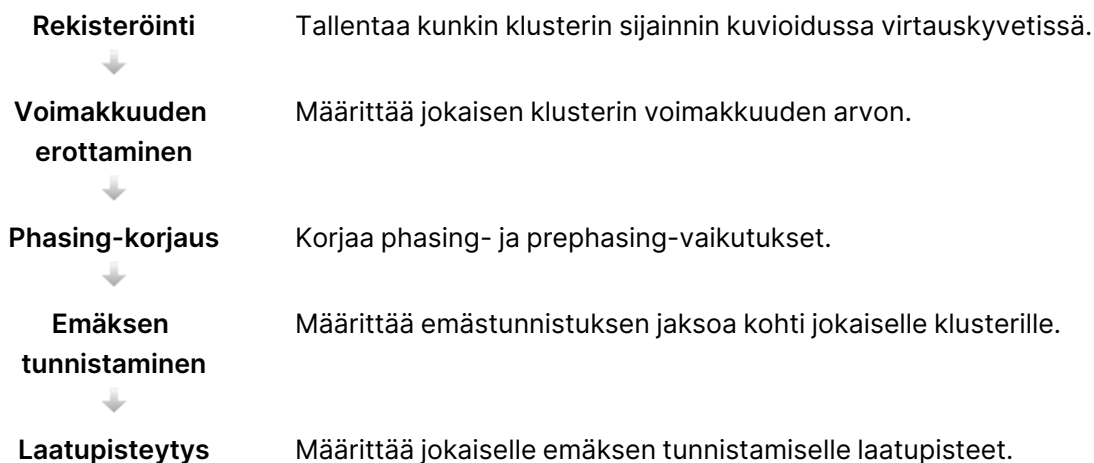
Virtauskyvetin osa	S2	S4	Kuvaus
Kaistat	2	4	Kaista on fyysinen kanava, jossa on tulo- ja lähtöportit.
Pinnat	2	2	S2- ja S4-virtauskyvetit kuvataan kahdelta pinnalta: ylä- ja alapinnalta. Ruudun yläpinta kuvataan ensin.
Pyyhkäisyalueet kaistaa kohden	4	6	Pyyhkäisyypinta on virtauskyvetin kaistan pylväs, jonka kamera sieppaa yhtenä skannattuna kuvana.

Virtauskyvetin osa	S2	S4	Kuvaus
Ruutuja pyyhkäisyypintaa kohti	88	78	Ruutu on osa pyyhkäisyypintaa ja kuvaa kuvannettua aluetta virtauskyvetissä.
Ruutuja luotu yhteensä	1408	3744	Kaistat × pinnat × pyyhkäisyypinnat × ruudut pyyhkäisyypintaa kohti vastaavat ruutujen kokonaismäärää.

Ruudun nimi on viisinumeroinen luku, joka edustaa ruudun asemaa virtauskyvetissä. Esimerkiksi ruudun nimi 1_1205 tarkoittaa kaistaa 1, yläpintaa, pyyhkäisyypintaa 2, ruutua 5.

- Ensimmäinen numero on kaistan numero:
 - 1 tai 2 S2-virtauskyvettä varten.
 - 1, 2, 3 tai 4 S4-virtauskyvettä varten.
- Toinen numero tarkoittaa pintaa: 1 yläpintaa ja 2 alapintaa.
- Kolmas numero tarkoittaa pyyhkäisyypinnan numeroa:
 - 1, 2, 3 tai 4 S2-virtauskyvettä varten.
 - 1, 2, 3, 4, 5 tai 6 S4-virtauskyvettä varten.
- Viimeiset kaksi lukua edustavat ruudun numeroa. Numerointi alkaa numerosta 01 virtauskyvetin lähtöpäässä ja päättyy numeroon 88 tai 78 tulopäässä.
 - 01–88 S2-virtauskyvettä varten.
 - 01–78 S4-virtauskyvettä varten.

Real-Time Analysis -ohjelmiston työnkulku



Rekisteröinti

Rekisteröinnillä kuva kohdistetaan kierrettyyn neliömäiseen nanokaivoryhmään kuvioidussa virtauskyvetissä. Nanokaivojen järjestetyn järjestyksen vuoksi kunkin klusterin X- ja Y-koordinaatit ovat ruudussa ennalta määritettyjä. Klusterin asemat kirjoitetaan kussakin ajossa klusterin sijaintitiedostoon (s.locs).

Jos rekisteröinti epäonnistuu jakson jossakin kuvassa, emäksiä ei tunnisteta kyseiselle ruudulle tässä jaksossa.

Intensiteetin erottaminen

Rekisteröinnin jälkeen voimakkuuden erottamisella lasketaan tietyn kuvan kunkin nanokaivon voimakkuusarvo. Mikäli rekisteröinti epäonnistui, kyseisen ruudun voimakkuutta ei voida erottaa.

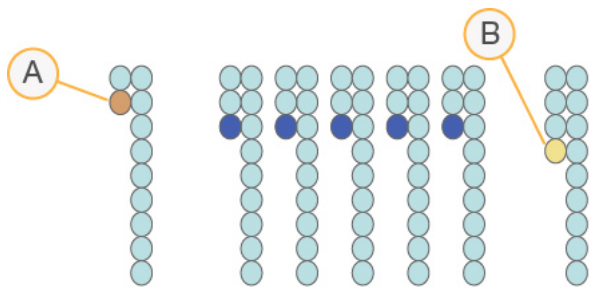
Phasing-korjaus

Sekvensointireaktion aikana jokainen klusterin DNA-juoste laajenee yhdellä emäksellä jaksoa kohden. Phasing- ja prephasing-korjaus tapahtuvat, kun juoste siirtyy epätahtiin nykyisen inkorporaatiojakson kanssa.

Phasing tapahtuu, kun emäksen inkorporaatio jää jälkeen.

Prephasing-korjaus tapahtuu, kun emäksen inkorporaatio nopeutuu.

Kuva 12 Phasing- ja Prephasing-korjaus



- A. Read emäksen kanssa, jossa phasing-korjaus
- B. Read emäksen kanssa, jossa prephasing-korjaus.

RTA3 korjaa phasing- ja prephasing-vaikutukset, mikä maksimoi tietojen laadun ajon jokaisessa jaksossa.

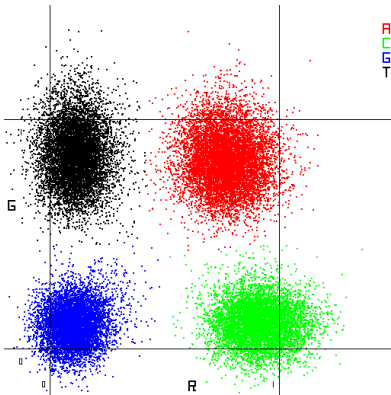
Emäksen tunnistaminen

Emäksen tunnistamisessa määritetään emäs (A, C, G tai T) tietyn rakenteen jokaiseen klusteriin tietystä jaksossa. NovaSeq 6000Dx -laite:ssä käytetään kaksikanavaista sekvensointia, joka edellyttää vain kahta kuvaa neljän DNA-emäksen koodaukseen, yhtä kuvaa vihreästä kanavasta ja yhtä punaisesta kanavasta.

Ei tunnistusta määritetään N:ksi. Tunnistuksia ei ole, kun klusteri ei läpäise suodatinta, rekisteröinti epäonnistuu tai klusteri siirtyy pois kuvasta.

Kunkin klusterin intensiteetit erotetaan punaisista ja vihreistä kuvista, ja niitä verrataan toisiinsa, jolloin syntyy neljä erillistä populaatiota. Jokainen populaatio vastaa emästä. Emäksen tunnistamisprosessilla määritetään, mihin perusjoukkoon kukin klusteri kuuluu.

Kuva 13 Klusterivoimakkuuden näyttö



Taulukko 8 Emästen määrittäminen kaksikanavasekvensoinnissa

Emäs	Punainen kanava	Vihreä kanava	Tulos
A	1 (käytössä)	1 (käytössä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden sekä punaisessa että vihreässä kanavassa.
C	1 (käytössä)	0 (ei käytössä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden vain punaisessa kanavassa.
G	0 (ei käytössä)	0 (ei käytössä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden tunnetussa klusterisijainnissa.
T	0 (ei käytössä)	1 (käytössä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden vain vihreässä kanavassa.

Suodattimen läpäisevät klusterit

Ajon aikana RTA3 suodattaa raakatiedot poistaakseen luvut, jotka eivät ylitä tietojen laatuksennystä. Päällekkäiset ja huonolaatuiset klusterit poistetaan.

Kaksikanavaisessa analyysissä RTA3 määrittää emästunnistuksen puhtauden (intensiteetin puhtauden mitta) perusjoukkoon perustuvan järjestelmän avulla. Klusterit läpäisevät suodattimen, kun enintään yhden emäksen tunnistamisen puhtaus ensimmäisissä 25 jaksossa on kiinteän kynnysarvon alapuolella. Kun PhiX-kohdistus on mukana, se suoritetaan jaksossa 26 laattojen alajoukossa klustereille, jotka läpäisivät suodattimen. Klustereiden, jotka eivät läpäise suodatinta, emäksiä ei tunnisteta eikä kohdisteta.

Laatupistemäärät

Laatupiste (Q-piste) on ennustus virheellisen emäksen tunnistamisen todennäköisyydestä. Korkeampi laatupiste osoittaa, että emäksen tunnistaminen on korkeampaa laatua ja todennäköisemmin oikein. Kun Q-pisteet on määritetty, tulokset rekisteröidään CBCL-tiedostoihin.

Q-pisteellä esitetään ytimekkäästi pienet virhetodennäköisyydet. Laatupisteet esitetään Q(X)-arvoina, jossa X ilmaisee pisteet. Seuraavassa taulukossa on esitetty laatupisteiden ja virhetodennäköisyyden välinen suhde.

Q-pisteet Q(X)	Virhetodennäköisyys
Q40	0,0001 (yksi 10 000:sta)
Q30	0,001 (yksi 1 000:sta)
Q20	0,01 (yksi 100:sta)
Q10	0,1 (yksi 10:stä)

Laatupisteytys ja raportointi

Laatupisteytyksessä lasketaan jokaiselle emästunnistukselle ennustimien joukko ja käytetään sitten ennustinarvoja Q-pistemäärän etsimiseen laatutaulukosta. Laatutaulukot luodaan optimaalisesti tarkkojen laatuennustusten saamiseksi ajoista, jotka on luotu sekvensointialustan ja kemiaversioin tietyllä määrityksellä.

Laatupisteytys perustuu Phred-algoritmin muokattuun versioon.

Jotta voidaan luoda Q-taulukko NovaSeq 6000Dx -laite -laitteelle, määritettiin kolme emästunnistuksen ryhmää näiden ennakoivien ominaisuuksien klusteroinnin perusteella. Emästen tunnistusten ryhmittelyn jälkeen keskimääräinen virhemäärä laskettiin empiirisesti kunkin kolmen ryhmän kohdalla, ja vastaavat Q-pisteet tallennettiin Q-taulukkoon kyseisen ryhmän kanssa korreloivien ennakoivien ominaisuuksien rinnalle. Näin RTA3:n osalta vain kolme Q-pistemäärää ovat mahdollisia, ja nämä Q-pistemäärät edustavat ryhmän keskimääräistä virhemäärää. Tämä tuottaa kaikkiaan tulokseksi yksinkertaistetun mutta erittäin tarkan laatupisteytyksen. Laatutaulukon kolme ryhmää vastaavat marginaalisia (< Q15), keskitasoa (~Q20) ja korkealaatuisia (> Q30) emästen tunnistuksia emästunnistuksia, ja niille määritetään vastaavat tietyt pistemäärät: 12, 26 ja 34. Lisäksi nollapistemääräksi määritetään 2, kun emästen tunnistuksia ei ole. Tällä Q-pisteiden raportointimallilla tallennustilan ja kaistanleveyden vaatimuksia vähennetään ilman, että se vaikuttaa tarkkuuteen tai suorituskykyyn.

Kuva 14 Yksinkertaistettu Q-pisteytys RTA3:n avulla



Sekvensoinnin tuotostiedostot

Tiedostotyyppi	Tiedoston kuvaus, sijainti ja nimi
Emästen tunnistamistiedostot	Jokainen analysoitu klusteri sisältyy emäksen tunnistamistiedostoon, koottuna yhdeksi tiedostoksi jaksoa, kaistaa ja pintaa kohti. Koottu tiedosto sisältää emästen tunnistamisen ja koodatun laatupesteytyksen jokaiselle klusterille. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[<i>lane</i>][<i>surface</i>].cbcl, esimerkiksi L001_1.cbcl
Klusterien sijaintitiedostot	Kunkin virtauskyvetin kohdalla binäärinen klusterisijaintitiedosto sisältää ruudun klustereiden XY-koordinaatit. Kuusikulmainen asettelu, joka vastaa virtauskyvetin nanokaivoasettelua, määrittää koordinaatit ennalta. Data\Intensities s_[<i>lane</i>].locs
Suodatintiedostot	Suodatintiedosto määrittää, läpäisikö klusteri suodattimet. Suodatintiedostot luodaan 26 jaksossa 25 jakson tietojen perusteella. Jokaiselle laatalle luodaan yksi suodatintiedosto. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[<i>lane</i>][<i>tile</i>].filter
Ajotietojen tiedosto	Sisältää ajon nimen, kunkin readin jaksojen määrän, virtauskyvetin pyyhkäisyalueiden ja ruutujen määrän sekä tiedon siitä, onko read indeksoitu read. Ajotietojen tiedosto luodaan ajon alussa. [Root folder],RunInfo.xml


Tiedostotyyppi	Tiedoston kuvaus, sijainti ja nimi
Pikkukuvatiedostot	Pikkukuvat kunkin sekvensointiluvun ensimmäistä jaksoa varten. Thumbnail_Images\L001\C[X.1] – Tiedostot tallennetaan alikansioon kullekin jaksolle. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg – Pikkukuva sisältää ruudun numeron.


Sekvensoinnin tuotoskansion rakenne

NVOS luo tuotoskansion nimen automaattisesti.


 **Config** (Määrit.) – Ajon määrittämissä asetukset.


 **Logs** (Lokit) – Lokitiedostot, jotka kuvaavat käyttövaiheita, laiteanalytiikkaa ja RTA3-tapahtumia.

 SampleSheet.csv – Näytetiedosto tai muu liitetty tiedosto, jos tämä soveltuu.

 **Data** (Tiedot)

 **Intensities** (Voimakkuudet)

 **BaseCalls** (Emästen tunnistaminen)

 **L00[X]** – Emästunnistustiedostot (*.cbcl), jotka kootaan yhteen tiedostoon kaistaa, pintaa ja jaksoa kohti.


 s.locs – Klusterin sijaintitiedosto ajoa varten.

 **InterOp** – binääritiedostot.

 **Recipe** (Resepti) – Ajokohtainen reseptitiedosto.

 **Thumbnail Images** (Pikkukuvat) – Pikkukuvat joka 10. ruudulle.

 **LIMS** – Ajon käyttöönottotiedosto (*.json), jos tämä soveltuu.

 **Audit** (Valvonta)

 AuditInfo.xml

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 SequenceComplete.txt

 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt

 Manifest.tsv

Varoitukset ja varotoimet



HUOMIO

USA:n liittovaltion laki rajoittaa tämän laitteen myyntiä niin, että sen saa myydä vain lääkäri tai muu terveydenhoidon ammattilainen, jolla on kyseisen osavaltion luvat ammatin harjoittamiseen. Sama koskee laitteen käyttöä tai sen määräämistä käyttöön.

- **Jotkin Illuminan toimittamat NovaSeq 6000Dx -laite -laitteen kanssa käytettävät reagenssit sisältävät mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti.** Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (KTT) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.
- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, seurauksena voi olla virheellisiä tuloksia tai näytteiden laadun merkittävää heikentymistä.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai sarjareagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja sarjareagenssien käsittelyn jälkeen.
- Asianmukaisten laboratoriotyökalujen ja hyvän laboratoriohygienian noudattaminen on välttämätöntä, jotta PCR-tuotteet eivät kontaminoi reagensseja, instrumentteja ja genomisen DNA:n näytteitä. PCR-kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- Jotta kontaminoituminen voidaan välttää, varmista, että vahvistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on työvaiheisiin tarkoitettut laitteet ja tarvikkeet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, koeputkiravistelijat ja sentrifugit).
- Indeksien ja näytteen parinmuodostus edellyttää, että se vastaa täsmälleen indeksilevyn asettelua. DNA Prep with Enrichment -sovellus täyttää automaattisesti indeksialukkeet, jotka liittyvät näytenimiin, kun niitä annetaan ajon käyttöönoton aikana. Käyttäjää kehoitetaan tarkistamaan näytteisiin liitetyt indeksialukkeet ennen sekvensointiajon aloittamista. Näytteen ja alustan asettelu väliset yhteensopimattomuudet johtavat positiivisen näytteen tunnistuksen menetykseen ja virheellisen tuloksen raportointiin.
- Asennus käyttäjän hankkimaa virustorjuntaohjelmaa suositellaan vahvasti, jotta tietokone olisi turvassa viruksilta.
- Älä käytä NovaSeq 6000Dx -laitetta, jos jokin sen paneeli on irrotettu. Jos laitetta käytetään jokin paneeli irrotettuna, vaarana on altistuminen verkko- ja tasavirtajännitteille.
- Älä koske virtauskyvetin virtauskyvettiasemaan. Siinä olevan lämmittimen lämpötila on 22–95 °C ja voi johtaa palovammoihin.
- Laite painaa noin 480 kg, joten sen pudottaminen tai käsitteleminen väärin voi aiheuttaa vakavan tapaturman.

Suorituskykyominaisuudet

Suorituskykyominaisuudet NovaSeq 6000Dx -laitteelle määritettiin käyttämällä Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ää kirjaston valmistamiseen ja NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)- ja NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -laitteita sekvensointiin sekä DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -reagensseja toissijaiseen analyysiin, jotka sisälsivät ituradan ja somaattisten varianttien havaitsemisen. Tutkimuksiin sisältyivät näytteen indeksointi, näytteen siirto, DNA:n syöte, analyttinen herkkyys (tyhjän raja / määrityksen tunnistusraja), tarkkuus, menetelmän vertailu ja toistettavuus. Katso *Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkausseloste* -pakkausselosteesta tietoa suorituskykyominaisuuksista, jotka liittyvät analyysia edeltäviin tekijöihin, kuten uuttamismenetelmiin tai häiritseviin aineisiin.

Suorituskykyominaisuuksissa käytettyjen laskelmien määritelmät

1. Positiivinen yhtäpitävyysprosentti (PPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu varianteiksi viitemenetelmällä ja jotka määrittämisestä oikeaoppisesti ilmoittaa.
 - $(\text{määrityksen oikeaoppisesti ilmoittamien varianttisijaintien luku}) / (\text{varianttisijaintien kokonaisluku})$
Varianttisijainnit, jotka määrittämisestä ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita positiivisia (TP). Varianttisijainnit, jotka määrittämisestä ilmoittaa viitetunnistuksiksi tai erilaisiksi varianttitunnistuksiksi, ovat vääriä negatiivisia (FN).
2. Negatiivinen yhtäpitävyysprosentti (NPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka on luokiteltu wild-tyyppiseksi viitemenetelmällä ja jotka määrittämisestä oikeaoppisesti ilmoittaa.
 - $(\text{määrityksen oikein ilmoittamien wild-tyypin sijaintien määrä}) / (\text{wild-tyyppisten sijaintien kokonaismäärä})$
Wild-tyypin sijainnit, jotka määrittämisestä ilmoittaa ja jotka ovat yhteneviä viitemenetelmän kanssa, ovat oikeita negatiivisia (TN). Wild-tyypin sijainnit, jotka määrittämisestä ilmoittaa variantteina, ovat vääriä positiivisia (FP).
3. Yleinen yhtäpitävyysprosentti (OPA) lasketaan osuutena sijainneista, jotka määrittämisestä on oikeaoppisesti ilmoittanut suhteessa viitemenetelmään.
 - $((\text{määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama varianttien sijaintien luku}) + (\text{määrityksen oikeaoppisesti ilmoittama wild-tyyppisten sijaintien lukumäärä})) / ((\text{varianttien sijaintien lukumäärä yhteensä}) + (\text{wild-tyyppisten sijaintien lukumäärä yhteensä}))$
4. PPA:n, NPA:n ja OPA:n laskelmat eivät sisällä ei-tunnistuksia (variantin tai viitteen sijainteja, jotka eivät täytä yhtä tai useampaa laatusuodatinta).
5. Positiivisten tunnistusten prosenttiosuus (PPC) on niiden havaintojen määrä, joissa variantti havaittiin, jaettuna testattujen havaintojen kokonaismäärällä, pois lukien kaikki kelpaamattomat havainnot tai ne, jotka suodatettiin alhaisena syvyytenä.

6. Negatiivisten tunnistusten prosenttiosuus (PNC) lasketaan niiden havaintojen määränä, joiden tuloksena jossakin asemassa on läpäisevä viite, jaettuna testattujen havaintojen kokonaismäärällä, pois lukien kaikki kelpaamattomat havainnot tai ne, jotka suodatettiin alhaisena syvyytenä.
7. Autosomin tunnistettavuuden prosenttiosuus lasketaan ei-N-viiteasemien prosenttiosuutena kohteena olevilla alueilla autosomaalisissa kromosomeissa, joissa on läpäisevä genotyyppitunnistus.

Näytteen indeksointi

Näytteen indeksialukkeet, jotka lisättiin kirjaston valmistelun aikana, antavat yksilöllisen sekvenssin kullekin näyte-DNA:lle. Näiden yksilöllisten sekvenssien avulla monet näytteet voidaan yhdistää yhteen sekvensointiajoon. Näytteen indeksoimista käytetään sekä iturata- että somaattisissa työnkuluissa. Tällä tutkimuksella tahdottiin määrittää vähimmäismäärä (12) ja enimmäismäärä (192) näytteille, jotka voidaan prosessoida yhdessä sekvensointiajossa NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa. Kaksitoista yksilöllistä Platinum Genome -DNA-näytettä (NA12877–NA12888) testattiin vähintään 12:lla eri indeksialukeyhdistelmällä näytettä kohti. Näytekirjastot valmistettiin käyttämällä esimerkkimäärittystä, joka oli suunniteltu tekemään haku erilaisista geeneistä, jotka kattoivat 1 970 505 emästä kaikissa 23 ihmiskromosomissa. Näytetuloksia neljästä sekvensointiajosta käyttäen DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua vertailtiin Platinum Genomes -versioon 2016-1.0.

Ajojen ensimmäisen sarjan osalta sekvensoitiin 192 yksilöllisesti indeksoitua näytekirjastoa kahdessa sekvensointiajossa, joista yksi niin S2- kuin S4-reagensseilla, jotta todennettaisiin sekä indeksien tuettu enimmäismäärä että määrityksen kyky tehdä genotyypin tunnistus yhdenmukaisesti tietyille näytteelle erilaisten indeksialukeyhdistelmien poikki. Ajojen toisen sarjan osalta sekvensoitiin 12 yksilöllisesti indeksoitua näytekirjastoa kahdessa sekvensointiajossa, joista yksi niin S2- kuin S4-reagenssilla, jotta todennettaisiin indeksien tuettu vähimmäismäärä.

192 indeksiajon osalta PPA SNV:ille oli 99,7–100 %, PPA insertioille oli 100 %, PPA deleetioille oli 96,7–100 % ja NPA oli 100 %. 12 indeksiajon osalta PPA SNV:ille oli 99,7–100 %, PPA insertioille oli 89,6–100 %, PPA deleetioille oli 94,6–100 % ja NPA oli 100 %.

Näytteen siirto

NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella on mahdollista sekvensoida monta näytettä ja tarkastusta yhdessä sekvensointiajossa. Tutkimus suoritettiin näytteen siirron laajuuden arvioimiseksi sekvensointiajossa (ajon sisällä) ja sekvensointiajojen välissä (ajosta ajoon). Kaksi Platinum Genomen DNA-näytettä, yksi uros ja yksi naaras, testattiin edustavalla määrityksellä, joka on suunniteltu suorittamaan hakuja eri geeneille 1 970 505 emäksestä 23 ihmiskromosomissa, mukaan lukien molemmissa sukukromosomeissa. Kirjastot sekvensoitiin NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella käyttäen DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua. Siirto urosnäytteistä naarasnäytteisiin havaittiin tarkkailemalla Y-kromosomin kohteiden readien läsnäoloa naarasnäytteissä.

Ajon sisäinen siirto voidaan ottaa käyttöön klusterin luomisen, indeksin jakson emästen tunnistuksen ja näytteen demultipleksoinnin aikana. Näytteen kulkeutumisen testaamiseksi sekvensointiajossa sekvensoitiin kirjastopooli, joka koostui vähintään kahdestatoista rinnakkaisnäytteestä, joista jokainen oli yksilöllinen uros- tai

naarasnäyte, sekä kahdesta mallittomasta kontrollista, jolloin saatiin yhteensä 192 yksilöllisesti indeksoitua kirjastoa, NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa kahdessa sekvensointiajossa, yksi S2- ja yksi S4-reagenssien kanssa. Ajon sisäinen näytesiirto arvioitiin vertailemalla Y-kromosomin kohdekattavuutta kussakin naarasreplikaatissa keskimääräiseen Y-kromosomin kohdekattavuuteen kaikissa poolin urosreplikaateissa. Havaitun ajon sisäisen kulkeutumisen 95. prosenttipiste oli 0,0090 % ja 0,041 % vastaavasti S2- ja S4-reagensseille.

Ajosta ajoon tapahtuvan näytteen kulkeutumisen testaamiseksi valmistettiin kaksi kirjastopoolia, jotka sekvensoitiin peräkkäin yhdessä NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa puolen A käyttäessä S4-reagensseja ja puolen B käytettäessä S2-reagensseja. Ensimmäinen pooli sisälsi vähintään kaksitoista kuuden yksilöllisen naarasnäytteen replikaattia sekä kaksi mallitonta kontrollia, jolloin saatiin yhteensä 96 yksilöllisesti indeksoitua kirjastoa. Toinen pooli sisälsi vähintään kaksitoista kuuden yksilöllisen miesnäytteen replikaattia sekä kaksi mallitonta kontrollia, jolloin saatiin yhteensä 96 yksilöllisesti indeksoitua kirjastoa. Molemmat poolit käyttivät samaa indeksin sovittimien sarjaa. Naaraspooli sekvensoitiin ensin, minkä jälkeen vuorossa oli sekvensointiajo urospoolilla, minkä jälkeen tehtiin toinen toistosekvensointiajo naaraspoolilla. Ajosta ajoon tapahtuvaa näytteen kulkeutumista arvioitiin reagenssityypeittäin (S2 ja S4) vertaamalla Y-kromosomikohteen kattavuutta naispoolin toistoajon ja miespoolin ajon vastaavien replikaattien välillä. Havaitun ajosta ajoon tapahtuvan kulkeutumisen 95. prosenttipiste oli 0,0089 % ja 0,012 % vastaavasti S2- ja S4-reagensseille.

DNA-syöte

Veri (iturata)

Veren DNA-syötteen vaihteluväli määritettiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkausta varten DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta käyttäen NovaSeq 6000Dx -laitteelle. Tämä vaihteluväli arvioitiin käyttämällä sarjalaimennustutkimusta, jossa käytettiin kahdeksaa Platinum Genome -DNA-näytettä (NA12877–NA12884), joiden esimerkkimääritys oli suunniteltu kyselyn tekemiseen useista geeneistä, jotka kattoivat 1 970 505 emästä kaikkien 23 ihmiskromosomin poikki. Kirjastot sekvensoitiin yhdellä NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella käyttäen NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)- ja NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssin yhtä erää.

Seitsemän näytettä testattiin rinnakkaisnäytteenä kuudella DNA-syötemäärällä välillä 1000–10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ja 10 ng). Kahdeksas näyte (NA12884) testattiin yksinkertaisena näytteenä 10 ng:n määrällä ja rinnakkaisnäyttein kaikille muille syötemäärille. Tarkkuuden määrittämiseksi näyteenotyyppinä verrattiin Platinum Genomes -versioon 2016-1.0. Tulokset määritettiin kullekin syötemäärälle. PPA kullekin varianttityypille (SNV:t, insertiot ja deletiot) esitetään kohdassa [PPA-tulokset veren DNA:n kullekin syötemäärälle varianttityypeittäin sivulla 33](#). NPA esitetään kohdassa [NPA veren DNA:n kullekin syötemäärälle sivulla 33](#). Kaikkien syötetasojen tarkkuus oli samankaltainen. Suositeltu veren DNA:n syöte Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -laitteelle on 50–1000 ng, ja 1000 ng ja 10 ng antavat ala- ja ylärajan suorituskykyominaisuuksien täyttämiseen, kun sekvensoidaan NovaSeq 6000Dx -laitteella.

Taulukko 9 PPA-tulokset veren DNA:n kullekin syötemäärälle varianttityypeittäin

DNA-syöte (ng)	Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	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	Insertio	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	Deleetio	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	

Taulukko 10 NPA veren DNA:n kullekin syötemäärälle

DNA-syöte (ng)	TN	FP	Viitteen ei-tunnistukset	NPA (%)
10	115449045	384	285751	> 99,9
25	123012157	415	438153	> 99,9
50	122985299	369	465043	> 99,9
100	122976660	321	473730	> 99,9
250	122971099	331	479289	> 99,9
1000	122978527	324	471882	> 99,9

FFPE (somaattinen)

Formaliinifiksoidun parafiinivaletun (FFPE) DNA-syötteen vaihteluväli Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkaukselle DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta käyttäen määritettiin NovaSeq 6000Dx -laitteelle. Tämä arvioitiin käyttämällä sarjalaimennustutkimusta, jossa käytettiin kahta Platinum Genome -DNA-näytettä, joiden esimerkkimääritys oli suunniteltu kyselyn tekemiseen useista geeneistä, jotka kattoivat 1 970 505 emästä kaikkien 23 ihmiskromosomin poikki. Kirjastot sekvensoitiin yhdellä NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella käyttäen NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)- ja NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssin yhtä erää.

GM12877-näyte-DNA laimennettiin GM12878-näyte-DNA:lla, jotta luotiin GM12877-13 yksilöllisellä GM12877:llä heterotsygoottiseksi ja homotsygoottiseksi varianteiksi, joiden esiintymistiheydet olivat vastaavasti lähellä arvoja 6,5 % ja 13 %. Myös laimentamaton GM12877 testattiin. GM12877-13 testattiin rinnakkaisnäytteenä neljällä DNA:n syötemäärällä välillä 1000–25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng ja 25 ng). GM12877 testattiin yksinkertaisena näytteenä 250 ng:n määränä ja rinnakkaisnäyttein kaikille muille syötemäärille. Tarkkuuden määrittämiseksi näytevarianttien tunnistuksia verrattiin Platinum Genomes -versioon 2016-1.0. Tulokset määritettiin kullekin syötemäärälle. PPA kullekin varianttityypille (SNV:t, insertiot ja deleetiot) esitetään kohdassa [PPA-tulokset kullekin FFPE-DNA-syötteelle varianttityypeittäin ja kohde-*VAF*:n mukaan sivulla 34](#). NPA esitetään kohdassa [NPA kullekin FFPE-DNA-syötteelle sivulla 35](#). Kaikkien syötetasojen tarkkuus oli samankaltainen. FFPE-näytteille, joiden ΔCq -arvo on ≤ 5 , suositeltu veren DNA:n syöte Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkaukselle on 50–1000 ng, ja 1000 ng ja 25 ng antavat ala- ja ylärajan suorituskykyominaisuuksien täyttämiseen, kun sekvensoidaan NovaSeq 6000Dx -laitteella.

Taulukko 11 PPA-tulokset kullekin FFPE-DNA-syötteelle varianttityypeittäin ja kohde-*VAF*:n mukaan

DNA-syöte (ng)	Varianttityyppi	Odotetut variantit	Kohdelaimennus <i>VAF</i>									
			0,065					0,13				
			TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	PPA (%)	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	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	Insertio	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100	
25	Deleetio	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	

Taulukko 12 NPA kullekin FFPE-DNA-syötteelle

DNA-syöte (ng)	Odotettu wild-tyyppi	TN	FP	Viitteen ei-tunnistukset	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

Analyttinen herkkyys (tyhjän raja [LoB] ja havaitsemisraja [LoD])

Tämä tutkimus toteutettiin tyhjän rajan (LoB) ja havaitsemisrajan (LoD) arvioimiseksi DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysin työkulkua varten NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa. Tämä tutkimus toteutettiin käyttämällä esimerkkimäärittystä, joka on suunniteltu erilaisten geenien kyselyyn, jotka kattoivat 1 970 505 emästä kaikkien 23 ihmiskromosomin poikki. Platinum Genomen solulinjat GM12878 ja GM12877 fiksoitiin formaaliin ja peitettiin parafiinilla DNA:n eristämisen jälkeen. Valmistettiin GM12877:n laimennokset GM12878:aan sellaisten näytteiden saamiseksi, jota sisältävät 0 %, 4 %, 6,5 % ja 13 % GM12877:ää tilavuudesta, niin että 489 yksilöllisen GM12877-variantin (454 SNV:tä, 17 insertiota ja 18 deleetiota) varianttitiheydet olivat välillä 0–0,13. Näytekirjastot valmistettiin käyttäen Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkausreagenssien kahta erää ja sekvensoitiin kuuden peräkkäisen aloituspäivän aikana kahdella NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella ja kahdella NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)-reagenssin sekä NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)-reagenssin erällä, mikä on yhteensä kaksitoista sekvensointiajoa. Tämä johti 288 havaintoon kullekin variantille jokaisessa näytelaimennoksessa. LoB ja LoD laskettiin käyttämällä perinteistä lähestymistapaa, joka ilmoitetaan CLSI EP17-A2:ssa. LoB ja LoD laskettiin S2- ja S4-reagensseille erikseen poolaamalla kaikkien varianttien varianttitiheydet sekvensointiajossa kullekin reagenssityypille. Tyyppin I virheeksi määritettiin 0,01, ja tyyppin II virheeksi määritettiin 0,05.

LoB arvioitiin 489 sijainnille itsenäisesti kahden sekvensointierän yli kullekin reagenssityypille (S2 tai S4) ja kirjastovalmisteelle. S2-reagensseille LoB:n 95. prosenttipiste oli 2,9 %. S4-reagensseille LoB:n 95. prosenttipiste oli 2,2 %.

LoD laskettiin onnistuneesti 478/489 variantille S2:n osalta ja 485/489 variantille S4:n osalta. Variantin, joissa mitään LoD:tä ei määritetty yhdelle tai molemmille kirjastovalmisteille, suljettiin pois lopullisesta nimitystä LoD:stä NovaSeq 6000Dx -järjestelmälle. NovaSeq 6000Dx -järjestelmän LoD S2- ja S4-reagensseilla määritettiin ottamalla yksilöllisten variantti-LoD:iden 95. prosenttipiste. S2-reagensseille 95. prosenttipiste 478 variantti-LoD:n yli oli 4,8 %. S4-reagensseille 95. prosenttipiste 485 variantti-LoD:n yli oli 3,9 %.

Tarkkuus

Sukusolulinja

Seuraava tutkimus tehtiin variantin tunnistamisen tarkkuuden arvioimiseksi ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysin työnkulussa DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksessa NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa käyttäen NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -pakkausta. Neljä ainutkertaista Platinum Genome -DNA-näytettä testattiin käyttäen esimerkkinä määritystä, joka oli suunniteltu 1 970 505 emästä (9 232 kohdetta) kaikista 23 ihmiskromosomista kattavien erilaisten geenien tiedusteluun. Jokainen näytteistä testattiin 12 rinnakkaisnäytteenä paitsi NA12880, joka testattiin 11 rinnakkaisnäytteenä. Yhteensä tehtiin 18 ajoa käyttämällä kolmea sekvensointilaitetta, kolmea S2-reagenssierää ja kahta käyttäjää kuuden aloituspäivän aikana. SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden tarkkuus määritettiin vertailemalla tuloksia Platinum Genomes -versioon 2016-1.0.

Taulukko 13 Yhteenveto ituratayhteneväisyydestä

Kriteerit	Havainnot yhteensä ¹	Havainnon tulos ²	Ajokohtainen tulos ³
PPA SNV:lle	846	99,8	99,9
PPA insertioille	846	97,9	> 99,9
PPA deleetioille	846	96,9	99,9
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹Laskettu näytemääränä ajoa kohden (47) x ajojen lukumäärä (18) = 846.

²Pienin havaittu arvo rinnakkaisnäytteittäin kaikissa 18 ajossa.

³Alhaisin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti sivulla 37 sisältää tutkimustiedot, joissa esitetään positiivisen ja negatiivisen yhteneväisyyden prosenttiosuus näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan Platinum Genomes -versioon 2016-1.0 PPA:n laskentoja varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

Taulukko 14 Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti

Näyte	Autosomin tunnistettavuus	Odotetut variantit ¹	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	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 Varianttien kokonaismäärä kaikissa rinnakkaisnäytteissä 18 ajossa.

[Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella sivulla 37](#) sisältää tutkimustiedot, jotka on esitetty näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään. Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – havaitseminen arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu.

Taulukko 15 Ituratayhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella

Näyte	SNV:t			Insertiot			Deleetiot		
	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN	Odotettu	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

Näytteitä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indelien) tunnistamiseksi. Yleinen yhteenveto esitetään kohdassa [Ituradan indelin tunnistamisen yhteenveto sivulla 38](#). Indel-variantteja oli kaikkiaan 210 ja niiden koko vaihteli välillä 1–18 bp insertioiden osalta ja 1–21 bp deleetioiden osalta.

Taulukko 16 Ituradan indelin tunnistamisen yhteenveto

Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	PPA
Insertio	36954	36953	1	0	> 99,9
Deleetio	29358	28986	16	356	99,9

Edustava määritys koostui 9 232 kohteesta, jotka kattoivat erilaista genomisisältöä. Kohteiden GC-sisältö vaihteli välillä 0,20–0,86. Kohteissa oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotidin ja trinukleotidin toistoja. Kromosomikohtaisesti kootut tiedot genomisisällön vaikutuksen määrittämiseksi oikeiden tunnistusten prosenttiosuuteen esitellään kohdassa [Ituradan kromosomitasoinen tarkkuus sivulla 38](#). Oikeiden tunnistusten prosenttiin kuuluvat variantti- ja viitetunnistukset, ja se on alle 100 %, jos läsnä on virheellisiä tunnistuksia tai ei tunnistuksia ollenkaan.

Taulukko 17 Ituradan kromosomitasoinen tarkkuus

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr1	47	728	138328	PolyA (12), PolyC (7), PolyT (14), PolyG (7), dinukleotidi (22), trinukleotidi (8), insertio (18), deleetio (4)	[0,22 - 0,8]; mediaani: 0,51	114888718	34	966860	> 99,9	0,83

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr2	39	628	159588	PolyA (46), PolyC (8), PolyT (23), PolyG (7), dinukleotidi (22), trinukleotidi (8), insertio (5), deleetio (2)	[0,24 - 0,81]; mediaani: 0,44	132293464	798	460345	> 99,9	0,35
chr3	38	650	137627	PolyA (18), PolyC (6), PolyT (18), PolyG (7), dinukleotidi (12), trinukleotidi (6), insertio (11), deleetio (1)	[0,25 - 0,86]; mediaani: 0,45	114625053	2	226461	> 99,9	0,20

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr4	17	370	73766	PolyA (9), PolyC (7), PolyT (25), PolyG (6), dinukleotidi (5), trinukleotidi (5), insertio (2), deleetio (2)	[0,27 - 0,77]; mediaani: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	PolyA (10), PolyC (6), PolyT (12), PolyG (7), dinukleotidi (10), trinukleotidi (8), insertio (8), deleetio (18)	[0,29 - 0,79]; mediaani: 0,46	75314497	912	153061	> 99,9	0,20

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr6	39	453	126721	PolyA (28), PolyC (7), PolyT (33), PolyG (7), dinukleotidi (18), trinukleotidi (11), insertio (4), deleetio (2)	[0,24 - 0,79]; mediaani: 0,48	103412695	1	182361	> 99,9	0,18
chr7	21	450	161501	PolyA (27), PolyC (8), PolyT (21), PolyG (7), dinukleotidi (31), trinukleotidi (5), insertio (1), deleetio (4)	[0,2 - 0,77]; mediaani: 0,46	132534074	19	246884	> 99,9	0,19

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr8	18	381	67775	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (13), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (9), insertio (4), deleetio (1)	[0,26 - 0,78]; mediaani: 0,47	56247612	411	170925	> 99,9	0,30
chr9	23	347	87100	PolyA (12), PolyC (7), PolyT (27), PolyG (8), dinukleotidi (9), trinukleotidi (9), insertio (4), deleetio (1)	[0,27 - 0,83]; mediaani: 0,49	72650800	20	241991	> 99,9	0,33

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr10	14	317	66723	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (6), dinukleotidi (16), trinukleotidi (6), insertio (1), deleetio (1)	[0,23 - 0,78]; mediaani: 0,44	55539058	1	188216	> 99,9	0,34
chr11	29	511	91786	PolyA (28), PolyC (8), PolyT (21), PolyG (7), dinukleotidi (26), trinukleotidi (7), insertio (2), deleetio (2)	[0,28 - 0,8]; mediaani: 0,47	75744222	742	259258	> 99,9	0,34

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr12	29	577	120365	PolyA (19), PolyC (8), PolyT (40), PolyG (7), dinukleotidi (7), trinukleotidi (7), insertio (1), deleetio (5)	[0,26 - 0,77]; mediaani: 0,49	99972530	1	542005	> 99,9	0,54
chr13	13	283	58639	PolyA (24), PolyC (6), PolyT (12), PolyG (7), dinukleotidi (6), trinukleotidi (8), insertio (14), deleetio (0)	[0,28 - 0,79]; mediaani: 0,42	48503179	1	45666	> 99,9	0,09

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr14	11	147	26980	PolyA (21), PolyC (6), PolyT (18), PolyG (11), dinukleotidi (6), trinukleotidi (6), insertio (4), deleetio (1)	[0,29 - 0,77]; mediaani: 0,47	22286153	198	147895	> 99,9	0,66
chr15	15	266	52091	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (13), PolyG (6), trinukleotidi (8), insertio (4), deleetio (6)	[0,29 - 0,76]; mediaani: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr16	21	366	80030	PolyA (7), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (10), insertio (15), deleetio (21)	[0,3 - 0,76]; mediaani: 0,54	65490245	16	1438278	> 99,9	2,15
chr17	36	645	118062	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (18), PolyG (8), dinukleotidi (13), trinukleotidi (6), insertio (18), deleetio (16)	[0,28 - 0,82]; mediaani: 0,49	97929929	417	335905	> 99,9	0,34

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr18	9	99	19195	PolyA (7), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (6), trinukleotidi (10), insertio (4), deleetio (0)	[0,22 - 0,78]; mediaani: 0,44	15967171	312	42077	> 99,9	0,26
chr19	30	605	104004	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (31), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (7), insertio (2), deleetio (21)	[0,33 - 0,83]; mediaani: 0,59	85642066	3	678213	> 99,9	0,79
chr20	12	179	33795	PolyA (6), PolyC (6), PolyT (7), PolyG (8), trinukleotidi (9), insertio (5), deleetio (0)	[0,31 - 0,84]; mediaani: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr21	5	63	30642	PolyA (28), PolyC (6), PolyT (24), PolyG (7), dinukleotidi (5), insertio (2), deleetio (5)	[0,22 - 0,78]; mediaani: 0,52	25319736	50	57434	> 99,9	0,23
chr22	10	187	36727	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (19), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (6), insertio (6), deleetio (0)	[0,27 - 0,74]; mediaani: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14
chrX	23	433	83576	PolyA (18), PolyC (8), PolyT (23), PolyG (9), dinukleotidi (5), trinukleotidi (23), insertio (3), deleetio (0)	[0,2 - 0,72]; mediaani: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chrY	0	40	5476	PolyA (11), PolyC (8), PolyT (11), PolyG (5), insertio (0), deleetio (0)	[0,4 - 0,59]; mediaani: 0,45	0	0	0	–	–

NA12878-näytteen sekvensointituloksia verrattiin NA12878:n erittäin luotettavaan genotyyppiin, jonka yhdysvaltalainen kauppaministeriön alainen virasto kansallinen standardointi- ja teknologianstituutti (NIST) on määrittänyt (v.2.19). 9 232 kohteesta 8 009 kohdetta sisältyi kokonaan erittäin luotettaville genomialueille, 776 kohdetta oli osittain päällekkäisiä ja 447 kohteella ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssissä. Tämä tuotti 1 831 483 koordinaattia vertailtavaa rinnakkaista kohti. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin luotuun ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19. Tulosten tarkkuus näytetään kohdassa [NA12878-näytteen ituratayhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa sivulla 49](#).

Taulukko 18 NA12878-näytteen ituratayhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa

Näyte	Katettujen kohteiden määrä	Autosomin tunnistettavuus	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	> 99,9	> 99,9	> 99,9

Tämän 18 ajon ituratatutkimuksen antamien tietojen perusteella NovaSeq 6000Dx -laite -laite kykenee yhdenmukaisesti sekvensoimaan seuraavia:

- GC-sisältö, joka on ≥ 20 % (kaikki tunnistetut emäkset 1692 sekvensoidussa kohdealueessa, joiden GC-sisältö on 20 %, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0 %)
- GC-sisältö, joka on ≤ 86 % (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joiden GC-sisältö on 86 %, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0 %)
- PolyA-pituudet, jotka ovat ≤ 46 (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 46 PolyA-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,27 %)

- PolyT-pituudet, jotka ovat ≤ 40 (13384074 emästä 13384321 tunnistetusta emäksestä 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 40 PolyT-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,26 %)
- PolyG-pituudet, jotka ovat ≤ 11 (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 11 PolyG-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0 %)
- PolyC-pituudet, jotka ovat ≤ 8 (9815030 emästä 9815035 tunnistetusta emäksestä 5922 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 8 PolyC-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,53 %)
- Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat $\leq 31x$ (32233922 emästä 32233926 tunnistetusta emäksestä 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 31 dinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,21 %)
- Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat $\leq 23x$ (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 23 trinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,21 %)
- Insertiopituudet, jotka ovat ≤ 18 (kaikki tunnistetut emäkset 1692 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 18 insertiota, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 7,71 %)
- Deleetiopituudet, jotka ovat ≤ 21 (kaikki tunnistetut emäkset 1692 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 21 insertiota, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 1,14 %)

Somaattinen

Tässä kuvattua tutkimusta käytettiin variantin tunnistamisen tarkkuuden arviointiin somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysin työnkulussa DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksessa NovaSeq 6000Dx -laite -laitteessa NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -pakkausta käyttäen.

Tutkimuksessa käytettiin esimerkkimääritystä, esimerkkimääritystä, joka oli suunniteltu erilaisten geenien kyselyyn, jotka kattoivat 1 970 505 emästä (9 232 kohdetta) kaikkien 23 ihmiskromosomin poikki. Platinum Genome -DNA uutettiin FFPE-käsitellyistä näyteblokeista, jotta voitiin luoda neljä ainutkertaista näytettä tutkimuksessa arvioitaviksi.

GM12877-näyte-DNA laimennettiin GM12878-näyte-DNA:lla, jotta luotiin GM12877-13 yksilöllisellä GM12877:llä heterotsygoottisiksi ja homotsygoottisiksi varianteiksi, joiden esiintymistiheydet olivat vastaavasti lähellä arvoja 6,5 % ja 13 %. GM12878-näyte-DNA laimennettiin samalla tavalla GM12877-näyte-DNA:lla, jotta luotiin GM12878-13 yksilöllisellä GM12878:llä heterotsygoottisiksi ja homotsygoottisiksi varianteiksi, joiden esiintymistiheydet olivat vastaavasti lähellä arvoja 6,5 % ja 13 %. Myös laimentamaton GM12877 ja GM12878 testattiin. Jokainen näytteistä testattiin 12 rinnakkaisnäytteenä paitsi laimentamaton GM12878, joka testattiin 11

rinnakkaisnäytteenä. Yhteensä tehtiin kahdeksantoista ajoa käyttämällä kolmea sekvensointilaitetta, kolmea S4-reagenssierää ja kahta käyttäjää kuuden aloituspäivän aikana. SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden tarkkuus määritettiin vertailemalla tuloksia Platinum Genomes -versioon 2016-1.0.

Taulukko 19 Yhteenvedo somaattisesta yhteneväisyydestä

Kriteerit	Havaintojen määrä ¹	Havaintojen tulos ²	Ajokohtainen tulos ³
PPA somaattisille SNV:ille	846	99,8	98,9
PPA somaattisille insertioille	846	100	100
PPA somaattisille deleetioille	846	100	100
NPA	846	> 99,9	> 99,9
OPA	846	> 99,9	> 99,9

¹ Laskettu kuten = näytemäärä ajoa kohti (47) x ajojen määrä (18) = 846.

² Pienin havaittu arvo rinnakkaisnäytteittäin kaikkien 18 ajon poikki.

³ Pienin arvo, kun kunkin ajon tiedot analysoidaan koosteena.

[Somaattinen yhteneväisyys näytekohtaisesti sivulla 51](#) sisältää tutkimustiedot, joissa esitetään positiivisen ja negatiivisen yhteneväisyyden prosenttiosuus näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään PPA:n laskelmia varten. Kolme varianttityyppiä (SNV:t, insertiot ja deleetiot) yhdistetään. Koska viitemenetelmä tarjoaa tulokset vain yhden nukleotidin varianteille ja insertioille/deleetioille, ei-varianttien emäksen tuloksia verrataan ihmisen genomien viitesekvenssiin hg19 NPA:n laskelmia varten.

Taulukko 20 Somaattinen yhteneväisyys näytekohtaisesti

Näyte	Autosomin tunnistettavuus	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1 008	365425810	1203	99,8	> 99,9	> 99,9
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	> 99,9	> 99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	> 99,9	> 99,9

Näyte	Autosomin tunnistettavuus	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	> 99,9	> 99,9

Somaattinen yhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella sivulla 52 sisältää tutkimustiedot, jotka on esitetty näytekohtaisesti ja joissa varianttituloksia verrataan hyvin karakterisoituun yhdistelmäviitemenetelmään. Kunkin varianttityypin – SNV:t, insertiot ja deleetiot – havaitseminen arvioidaan erikseen. Viitesijainnit on poissuljettu.

Taulukko 21 Somaattinen yhteneväisyys näytekohtaisesti varianttityypin perusteella

Näyte	SNV:t			Insertiot			Deleetiot		
	Odotettu	TP	FN	Odotettu	TP	FN	Odotettu	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

Neljä näytettä analysoitiin lisää pienten insertioiden ja deleetioiden (indel-varianttien) tunnistamiseksi. Yleinen yhteenveto esitetään kohdassa *Yhteenveto somaattisten indel-varianttien havaitsemisesta sivulla 52*. Indel-variantteja oli kaikkiaan 210 ja niiden koko vaihteli välillä 1–18 bp insertioiden osalta ja 1–21 bp deleetioiden osalta.

Taulukko 22 Yhteenveto somaattisten indel-varianttien havaitsemisesta

Varianttityyppi	Odotetut variantit	TP	FN	Variantin ei-tunnistukset	PPA
Insertio	11772	11772	0	0	100
Deleetio	10098	9666	0	432	100

Edustava määräys koostui 9 232 kohteesta, jotka kattoivat erilaista genomisisältöä. Kohteiden GC-sisältö vaihteli välillä 0,20–0,86. Kohteissa oli lisäksi joukko yksittäisen nukleotidin (esim. PolyA, PolyT), dinukleotidin ja trinukleotidin toistoja. Kromosomikohtaisesti kootut tiedot genomisisällön vaikutuksen määrittämiseksi oikeiden tunnistusten prosenttiosuuteen esitellään kohdassa *Somaattinen kromosomitason tarkkuus sivulla 53*. Oikeiden tunnistusten prosenttiin kuuluvat variantti- ja viitetunnistukset, ja se on alle 100 %, jos läsnä on virheellisiä tunnistuksia tai ei tunnistuksia ollenkaan.

Taulukko 23 Somaattinen kromosomitason tarkkuus

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr1	47	728	138328	PolyA (12), PolyC (7), PolyT (14), PolyG (7), dinukleotidi (22), trinukleotidi (8), insertio (3), deleetio (0)	[0,22 - 0,8]; mediaani: 0,51	110145939	52	5642613	> 99,9	4,9
chr2	39	628	159588	PolyA (46), PolyC (8), PolyT (23), PolyG (7), dinukleotidi (22), trinukleotidi (8), insertio (5), deleetio (1)	[0,24 - 0,81]; mediaani: 0,44	126795713	842	5850393	> 99,9	4,4

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr3	38	650	137627	PolyA (18), PolyC (6), PolyT (18), PolyG (7), dinukleotidi (12), trinukleotidi (6), insertio (1), deleetio (1)	[0,25 - 0,86]; mediaani: 0,45	109902527	593	4889226	> 99,9	4,3
chr4	17	370	73766	PolyA (9), PolyC (7), PolyT (25), PolyG (6), dinukleotidi (5), trinukleotidi (5), insertio (0), deleetio (1)	[0,27 - 0,77]; mediaani: 0,45	59373461	16	2517412	> 99,9	4,1

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr5	25	507	90008	PolyA (10), PolyC (6), PolyT (12), PolyG (7), dinukleotidi (10), trinukleotidi (8), insertio (8), deleetio (18)	[0,29 - 0,79]; mediaani: 0,46	72261191	723	3116981	> 99,9	4,1
chr6	39	453	126721	PolyA (28), PolyC (7), PolyT (33), PolyG (7), dinukleotidi (18), trinukleotidi (11), insertio (0), deleetio (1)	[0,24 - 0,79]; mediaani: 0,48	98593101	687	4890221	> 99,9	4,7

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr7	21	450	161501	PolyA (27), PolyC (8), PolyT (21), PolyG (7), dinukleotidi (31), trinukleotidi (5), insertio (1), deleetio (4)	[0,2 - 0,77]; mediaani: 0,46	126913574	104	5773856	> 99,9	4,4
chr8	18	381	67775	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (13), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (9), insertio (4), deleetio (0)	[0,26 - 0,78]; mediaani: 0,47	53430489	175	2958909	> 99,9	5,2

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr9	23	347	87100	PolyA (12), PolyC (7), PolyT (27), PolyG (8), dinukleotidi (9), trinukleotidi (9), insertio (0), deleetio (1)	[0,27 - 0,83]; mediaani: 0,49	69594586	74	3260257	> 99,9	4,5
chr10	14	317	66723	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (6), dinukleotidi (16), trinukleotidi (6), insertio (0), deleetio (0)	[0,23 - 0,78]; mediaani: 0,44	53209592	90	2469444	> 99,9	4,4

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr11	29	511	91786	PolyA (28), PolyC (8), PolyT (21), PolyG (7), dinukleotidi (26), trinukleotidi (7), insertio (2), deleetio (2)	[0,28 - 0,8]; mediaani: 0,47	72291795	150	3665560	> 99,9	4,8
chr12	29	577	120365	PolyA (19), PolyC (8), PolyT (40), PolyG (7), dinukleotidi (7), trinukleotidi (7), insertio (0), deleetio (3)	[0,26 - 0,77]; mediaani: 0,49	96109352	101	4331932	> 99,9	4,3

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr13	13	283	58639	PolyA (24), PolyC (6), PolyT (12), PolyG (7), dinukleotidi (6), trinukleotidi (8), insertio (14), deleetio (0)	[0,28 - 0,79]; mediaani: 0,42	46130028	44	2384839	> 99,9	4,9
chr14	11	147	26980	PolyA (21), PolyC (6), PolyT (18), PolyG (11), dinukleotidi (6), trinukleotidi (6), insertio (4), deleetio (0)	[0,29 - 0,77]; mediaani: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr15	15	266	52091	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (13), PolyG (6), trinukleotidi (8), insertio (4), deleetio (0)	[0,29 - 0,76]; mediaani: 0,46	41918631	184	1753300	> 99,9	4,0
chr16	21	366	80030	PolyA (7), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (10), insertio (15), deleetio (21)	[0,3 - 0,76]; mediaani: 0,54	62344351	18	4540539	> 99,9	6.8

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr17	36	645	118062	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (18), PolyG (8), dinukleotidi (13), trinukleotidi (6), insertio (18), deleetio (1)	[0,28 - 0,82]; mediaani: 0,49	93811318	414	4403622	> 99,9	4,5
chr18	9	99	19195	PolyA (7), PolyC (7), PolyT (15), PolyG (6), trinukleotidi (10), insertio (0), deleetio (0)	[0,22 - 0,78]; mediaani: 0,44	15007653	6	990633	> 99,9	6,2

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr19	30	605	104004	PolyA (19), PolyC (7), PolyT (31), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (7), insertio (2), deleetio (3)	[0,33 - 0,83]; mediaani: 0,59	81416722	455	4860311	> 99,9	5,6
chr20	12	179	33795	PolyA (6), PolyC (6), PolyT (7), PolyG (8), trinukleotidi (9), insertio (5), deleetio (0)	[0,31 - 0,84]; mediaani: 0,53	26833936	7	1301905	> 99,9	4,6
chr21	5	63	30642	PolyA (28), PolyC (6), PolyT (24), PolyG (7), dinukleotidi (5), insertio (1), deleetio (0)	[0,22 - 0,78]; mediaani: 0,52	24169250	44	1172087	> 99,9	4,6

Kromosomi	Geenien määrä	Kohteiden määrä	Emästen määrä	Genomisisältö	GC-alue	Oikeat tunnistukset	Virheelliset tunnistukset	Ei tunnistuksia	Oikeiden tunnistusten prosenttiosuus	Ei tunnistuksia, %
chr22	10	187	36727	PolyA (26), PolyC (7), PolyT (19), PolyG (7), dinukleotidi (5), trinukleotidi (6), insertio (6), deleetio (0)	[0,27 - 0,74]; mediaani: 0,51	28887217	86	1392179	> 99,9	4,6
chrX	23	433	83576	PolyA (18), PolyC (8), PolyT (23), PolyG (9), dinukleotidi (5), trinukleotidi (23), insertio (3), deleetio (0)	[0,2 - 0,72]; mediaani: 0,48	64231080	241	3852253	> 99,9	5,7
chrY	0	40	5476	PolyA (11), PolyC (8), PolyT (11), PolyG (5), insertio (0), deleetio (0)	[0,4 - 0,59]; mediaani: 0,45	0	0	0	-	-

GM12878-näytteen sekvensointituloksia verrattiin NA12878:n korkean luotettavuuden genotyyppiin, jonka yhdysvaltalainen kauppaministeriön alainen virasto kansallinen standardointi- ja teknologiainstituutti (NIST) on määrittänyt (v.2.19). 9 232 kohteesta 8 009 kohdetta sisältyi kokonaan erittäin luotettaville genomialueille, 776 kohdetta oli osittain päällekkäisiä ja 447 kohteella ei ollut päällekkäisyyksiä NIST-sekvenssissä. Tämä tuotti 1 831 483 koordinaattia vertailtavaa rinnakkaista kohti. Ei-varianttien emäksen tunnistuksia verrattiin luotuun ihmisgenomin viitesekvenssiin hg19. Tarkkuustulokset esitetään kohdassa [GM12878-näytteen somaattinen yhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa sivulla 64](#).

Taulukko 24 GM12878-näytteen somaattinen yhteneväisyys NIST-tietokannan kanssa

Näyte	Katettujen kohteiden määrä	Autosomin tunnistettavuus	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	> 99,9	> 99,9

Tämän 18 ajon somaattisen tutkimuksen antamien tietojen perusteella NovaSeq 6000Dx -laite -laite kykenee yhdenmukaisesti sekvensoimaan seuraavia:

- GC-sisältö, joka on ≥ 20 % (kaikki tunnistetut emäkset 1692 sekvensoidussa kohdealueessa, joiden GC-sisältö on 20 %, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 0,34 %)
- GC-sisältö, joka on ≤ 86 % (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joiden GC-sisältö on 86 %, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 4,21 %)
- PolyA-pituudet, jotka ovat ≤ 46 (14550082 emästä 14550083 tunnistetusta emäksestä 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 46 PolyA-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 4,18 %)
- PolyT-pituudet, jotka ovat ≤ 40 (12833489 emästä 12833491 tunnistetusta emäksestä 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 40 PolyT-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 4,37 %)
- PolyG-pituudet, jotka ovat ≤ 11 (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 11 PolyG-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 7,59 %)
- PolyC-pituudet, jotka ovat ≤ 8 (9405604 emästä 9405615 tunnistetusta emäksestä 5922 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 8 PolyC-toistoa, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 4,68 %)
- Dinukleotidin toistopituudet, jotka ovat $\leq 31x$ (30996684 emästä 30996712 tunnistetusta emäksestä 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 31 dinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 4,04 %)

- Trinukleotidin toistopituudet, jotka ovat $\leq 23x$ (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 23 trinukleotidin toisto, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 5,39 %)
- Insertiopituudet, jotka ovat ≤ 18 (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 18 insertiota, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 1,44 %)
- Deleetiopituudet, jotka ovat ≤ 21 (kaikki tunnistetut emäkset 846 sekvensoidussa kohdealueessa, joissa on 21 insertiota, tunnistettiin oikein ei-tunnistamisen määrän ollessa 7,86 %)

Tarkkuus

NovaSeq 6000Dx -laite -laitteen tarkkuus arvioitiin käyttämällä Platinum Genome -näytteitä, joiden edustava määräys on suunniteltu suorittamaan kysely laajasta geenivalikoimasta, johon kuuluu 1 970 505 emästä 23 eri kromosomissa käyttämällä 9 232 kohdeoligoa. Yhteensä arvioitiin 1723 kohteena olevaa varianttia (SNV:t, insertiot ja deleetiot). Ituratatestaus käsitti yksitoista tai kaksitoista rinnakkaisnäytettä neljästä yksilöllisestä Platinum Genome -näytteestä. Somaattinen testaus käsitti yksitoista tai kaksitoista rinnakkaisnäytettä neljästä yksilöllisestä FFPE-käsitellystä Platinum Genome -näytteestä eri VAF-tasoilla. Näytekirjastot valmistettiin käyttämällä Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkausreagensseja.

Testaus tehtiin yhdessä sisäisessä käyttöpaikassa käyttäen kolmea NovaSeq 6000Dx -laite -laitetta, kolmea NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa)-reagenssin sekä NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssin erää ja kahta käyttäjää kuuden aloituspäivän aikana. Kunkin aloituspäivän osalta sekvensoitiin ituratanäytekirjastot laitteen yhdellä puolella S2-reagensseja ja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua käyttäen, ja somaattiset näytekirjastot sekvensoitiin laitteen toisella puolella S4-reagensseja ja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua käyttäen. Tämä testaus sai aikaan 18 virtauskyvettä kullekin iturata- ja somaattiselle työnkululle.

Sukusolulinja

Iturata-ajojen osalta ne genomisijainnit, joissa havaitaan kohteena oleva ituratavariantti, ilmoitetaan merkinnällä positiivinen (variantti). Odotettujen positiivisten ituratavarianttien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistuspäivälle ja oikean positiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle (PPC) kussakin varianttityypissä (SNV, insertio, deleetio). [Laboration sisäinen täsmällisyys Ituratatunnistushavainnoissa odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin sivulla 66](#) -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 25 Laboration sisäinen täsmällisyys Ituratatunnistushavainnoissa odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaitut positiiviset tunnistukset ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	6	980316	< 0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Insertio	0	36738	0	36738	36738	100	> 99,99	100
Deleetio	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Positiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa variantti havaittiin.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Genomisijainnit, joissa kohteena olevaa varianttia ei havaita, ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppinen). Odotettujen negatiivisten sijaintien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistusten määrän ja negatiivisen tunnistuksen prosenttiosuuden (PNS) suhteen. [Laboratorion sisäinen täsmällisyys ituratatunnistuksen havainnoissa odotetuille negatiivisille tuloksille sivulla 67](#) -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 26 Laboratorion sisäinen täsmällisyys ituratatunnistuksen havainnoissa odotetuille negatiivisille tuloksille

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaittuja negatiivisia tunnistuksia ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wild-tyyppi	0	406170	0	406170	406170	100	> 99,99	100

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Negatiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemana, joissa varianttia ei havaittu.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Kunkin parametrin (laite, reagenssierä, päivä, kirjastoreplikaatti) osuus yleiseen variabiliteettiin määritettiin varianssin komponenttianalyyssissä käyttäen varianttitiheyttä vastemuuttujana. Yleisen keskihajonnan keskiarvo oli 0,0370. Suurin myötävaikutus varianttitiheyden variabiliteettiin oli kirjastoalvalmistereplikaateista, jotka vaikuttivat 17,1 %:n osuuteen kokonaisvariabiliteetista. Päivän osuus oli 1 %, kun taas laite ja reagenssierä vaikuttivat kumpikin alle 1 % kokonaisvariabiliteetista [Laboratorion sisäisen täsmällisyyden varianssikomponenttien estimaatit ituratanäytteen varianttitiheyksille sivulla 67](#) (SD = keskihajonta).

Taulukko 27 Laboratorion sisäisen täsmällisyyden varianssikomponenttien estimaatit ituratanäytteen varianttitiheyksille

Osa	Keskihajonta	Kokonaiskeskihajonnan keskiarvo %
Päivä	0,0020	1,028
Laite	0,0018	0,837
Tarvike-erä	0,0016	0,712
Kirjastoreplikaatti	0,0143	17,110
Yhteensä	0,0370	100

Somaattinen

Somaattisten ajojen osalta ne genomisijainnit, joissa havaitaan kohteena oleva somaattinen variantti, ilmoitetaan merkinnällä positiivinen (variantti). GM12877-13:n ja GM12878-13:n laimennettujen näytteiden osalta, joiden odotetut positiiviset somaattiset variantit VAF-arvoissa olivat 6,5–13 %, tiedot arvioitiin ei-tunnistummäärälle ja positiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle (PPC) kussakin varianttityypissä (SNV,

insertio, deleetio). [Laboratorion sisäinen täsmällisyys somaattisten tunnistusten havainnoissa odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin \(VAF on \$\geq 6,5\%\$ ja \$\leq 13\%\$ \) sivulla 68](#) -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 28 Laboratorion sisäinen täsmällisyys somaattisten tunnistusten havainnoissa odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin (VAF on $\geq 6,5\%$ ja $\leq 13\%$)

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaitut positiiviset tunnistukset ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Insertio	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Deleetio	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Positiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa variantti havaittiin.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Genomisijainnit, joissa kohteena olevaa somaattista varianttia ei havaita, ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppinen). Odotettujen negatiivisten sijaintien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistusten määrälle ja negatiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle. [Laboratorion sisäinen täsmällisyys somaattisen tunnistuksen havainnoissa odotetuille negatiivisille tuloksille sivulla 68](#) -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 29 Laboratorion sisäinen täsmällisyys somaattisen tunnistuksen havainnoissa odotetuille negatiivisille tuloksille

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaittuja negatiivisia tunnistuksia ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wild-tyyppi	0	194922	0	194919	194922	> 99,99	> 99,99	100

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Negatiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa varianttia ei havaittu.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Kunkin parametrin (laite, reagenssierä, päivä, kirjastoreplikaatti) osuus yleiseen variabiliteettiin määritettiin varianssin komponenttianalysissä käyttäen varianttitiheyttä vastemuuttujana. Yleisen keskihajonnan keskiarvo oli 0,0062. Kirjastoreplikaatit säilyivät variabiliteetin merkitevimpänä lähteenä vastaten 50,7 %:sta kokonaismäärää. Päivän, laitteen ja tarvike-erän osuus oli kaikilla alle 1 % [Laboratorion sisäisen täsmällisyyden varianssikomponenttien estimaatit somaattisen näytteen varianttitiheyksille sivulla 69](#) (SD = keskihajonta).

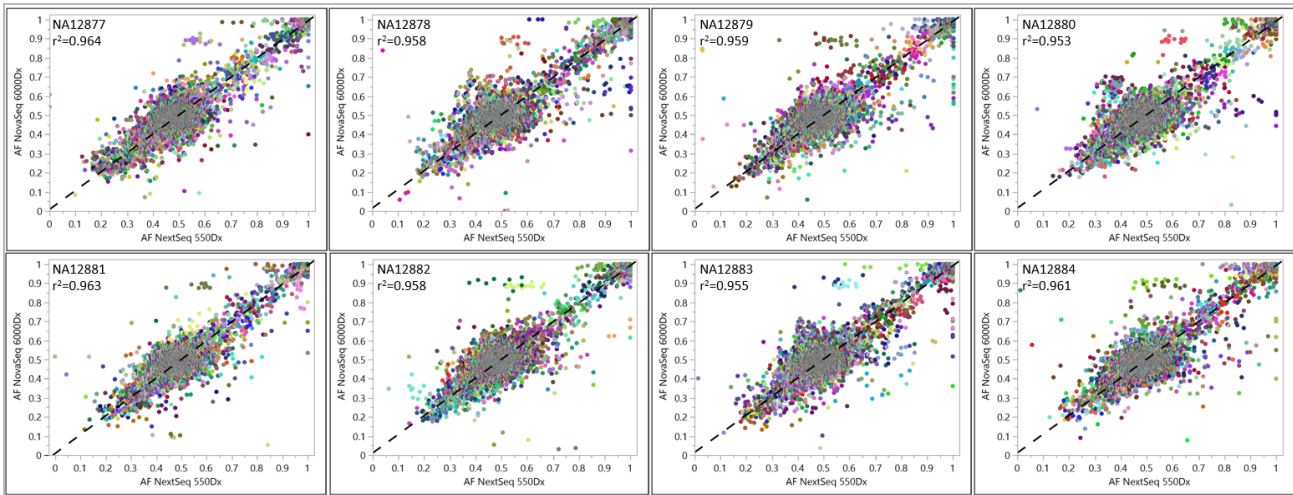
Taulukko 30 Laboratorion sisäisen täsmällisyyden varianssikomponenttien estimaatit somaattisen näytteen varianttitiheyksille

Osa	Keskihajonta	Kokonaiskeskihajonnan keskiarvo %
Päivä	0,0002	0,41
Laite	0,0002	0,40
Tarvike-erä	0,0002	0,35
Kirjastoreplikaatti	0,0044	50,7
Yhteensä	0,0062	100

Menetelmän vertailu

Tehtiin tutkimus suorituskyvyn vertaamiseksi NovaSeq 6000Dx -laitteen ja NextSeq 550Dx Instruments -laitteen välillä. Varianttitiheyden yhdenmukaisuutta verinäytteille arvioitiin käyttämällä esimerkkinä määritystä, joka oli suunniteltu 1 970 505 emästä kaikkien 23 ihmiskromosomin poikki kattavan erilaisen geenin kyselyyn. Kahdeksan Platinum Genome -DNA-näytettä testattiin, seitsemän kuutena rinnakkaisnäytteenä ja yksi (NA12881) viitenä rinnakkaisnäytteenä. Kirjastot sekvensoitiin NovaSeq 6000Dx -laite -laitteella käyttäen DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua sekä NextSeq 550Dx Instrument -laitteella käyttäen DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager -moduulia. [Varianttitiheyden korrelaatiokuvaajat \(Pisteet on esitetty värein yksilöllisen variantin mukaan. Variantit voidaan esittää eri värisinä kussakin yksittäisessä kuvaajassa.\) sivulla 70](#) esittää VAF-korrelaation kyseisen kahden laitteen välillä kullekin näytteelle. NovaSeq 6000Dx -laite- ja NextSeq 550Dx -laitteen välisen voimakkaan korrelaation vuoksi suorituskykyominaisuudet, jotka liittyvät analytiikkaa edeltäviin tekijöihin (esim. uuttamismenetelmät tai häiritsevät aineet) määritetään sopiviksi molempiin laitteisiin. Ks. lisätietoja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -tuoteselosteesta.

Kuva 15 Varianttitiheyden korrelaatiokuvaajat (Pisteet on esitetty värein yksilöllisen variantin mukaan. Variantit voidaan esittää eri värisinä kussakin yksittäisessä kuvaajassa.)



Toistettavuus

NovaSeq 6000Dx -laite -laitteen toistettavuus arvioitiin käyttämällä Platinum Genome -näytteitä, joiden edustava määritys on suunniteltu suorittamaan kysely laajasta geenivalikoimasta, johon kuuluu 1 970 505 emästä 23 eri kromosomissa käyttämällä 9 232 kohdeoligoa. Yhteensä arvioitiin 1723 kohteena olevaa varianttia (SNV:t, insertiot ja deleetiot). Ituratatestaus käsitti kolme tai neljä rinnakkaisnäytettä kahdestatoista yksilöllisestä Platinum-näytteestä. Somaattinen testaus käsitti viisi tai kuusi rinnakkaisnäytettä kahdeksasta yksilöllisestä FFPE-käsittelystä Platinum Genome -näytteestä eri VAF-tasoilla. Näytekirjastot valmistettiin käyttämällä Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkausreagensseja.

Testaus tehtiin kolmessa ulkoisessa käyttöpaikassa käyttäen yhtä NovaSeq 6000Dx S2 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssin erää ja yhtä NovaSeq 6000Dx S4 -reagenssi v1.5 -pakkaus (300 jaksoa) -reagenssin erää. Jokaisessa käyttöpaikassa käytettiin yhtä NovaSeq 6000Dx -laite -laitetta. Kaksi operaattoria suoritti testauksen kussakin paikassa. Kukin toimija suoritti testauksen kolmena ei-peräkkäisenä aloituspäivänä kunkin näytetyypin kohdalla yhteensä 36 virtauskyvetin verran kolmessa eri paikassa. Kunkin aloituspäivän osalta sekvensoitiin ituratanäytekirjastot laitteen puolella A ja S2-reagensseja ja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen ituradan FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua käyttäen, ja somaattiset näytekirjastot sekvensoitiin laitteen puolella B S4-reagensseja ja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulkua käyttäen. Tämä testaus sai aikaan 18 virtauskyvettä kullekin iturata- ja somaattiselle työnkululle.

Sukusolulinja

Iturata-ajojen osalta ne genomisijainnit, joissa havaitaan kohteena oleva ituratavariantti, ilmoitetaan merkinnällä positiivinen (variantti). Odotettujen positiivisten ituratavarianttien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistumäärälle ja oikean positiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle (PPC) kussakin varianttityypissä (SNV, insertio, deleetio).

Ituratunnistuksen havainnot odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin sivulla 71 -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 31 Ituratunnistuksen havainnot odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaitut positiiviset tunnistukset ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Insertio	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Deleetio	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Positiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa variantti havaittiin.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Genomisijainnit, joissa kohteena olevaa varianttia ei havaita, ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppinen). Odotettujen negatiivisten sijaintien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistusten määrän ja negatiivisen tunnistuksen prosenttiosuuden (PNS) suhteen. *Ituratunnistuksen havainnot odotetuille negatiivisille tuloksille sivulla 71* -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 32 Ituratunnistuksen havainnot odotetuille negatiivisille tuloksille

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaittuja negatiivisia tunnistuksia ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wild-tyyppi	0	393516	0	393516	393516	100	> 99,99	100

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Negatiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa varianttia ei havaittu.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Somaattinen

Somaattisten ajojen osalta ne genomisijainnit, joissa havaitaan kohteena oleva somaattinen variantti, ilmoitetaan merkinnällä positiivinen (variantti). Niiden odotettujen positiivisten somaattisten varianttien osalta, joissa keskimääräinen varianttialleelin esiintymistiheys (VAF) on suurempi tai yhtä suuri kuin 14 % ja pienempi tai yhtä suuri kuin 28 %, tiedot arvioitiin ei-tunnistumäärälle ja oikean positiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle (PPC) kussakin varianttityypissä (SNV, insertio, deleetio). *Somaattisten tunnistusten havainnot odotetuille*

positiivisille tuloksille varianttityypeittäin (keskimääräinen VAF $\geq 14\%$ ja $\leq 28\%$) sivulla 72 -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 33 Somaattisten tunnistusten havainnot odotetuille positiivisille tuloksille varianttityypeittäin (keskimääräinen VAF $\geq 14\%$ ja $\leq 28\%$)

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaitut positiiviset tunnistukset ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PPC	95 % LCL ³	95 % UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Insertio	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Deleetio	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Positiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa variantti havaittiin.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Genomisijainnit, joissa kohteena olevaa somaattista varianttia ei havaita, ilmoitetaan negatiivisina (wild-tyyppinen). Odotettujen negatiivisten sijaintien osalta tiedot arvioitiin ei-tunnistusten määrälle ja negatiivisen tunnistuksen prosenttiosuudelle. *Somaattisen tunnistuksen havainnot odotetuille negatiivisille tuloksille sivulla 72* -kohdassa annetaan yhteenveto havaituista määristä sekä kunkin varianttityypin 95 %:n luotettavuuden ala- ja ylätasot (LCL/UCL), jotka on laskettu Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 34 Somaattisen tunnistuksen havainnot odotetuille negatiivisille tuloksille

Varianttityyppi	Ei havaittuja tunnistuksia ¹	Tunnistuksia yhteensä	Ei-tunnistettujen prosenttiosuus	Havaittuja negatiivisia tunnistuksia ²	Arvioitavissa olevia tunnistuksia yhteensä	PNC	95 % LCL ³	95 % UCL
Wild-tyyppi	0	92718	0	92714	92718	> 99,99	99,99	100

¹ Ei tunnistusta määritelty kohteena olevana kromosomin asemana, jossa varianttia ei voida määrittää (johtuen matalasta kattavuussyvyydestä).

² Negatiivinen tunnistus määritelty kohteena olevina kromosomin asemina, joissa varianttia ei havaittu.

³ Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirja nro 200025276 v01	Syyskuu 2022	Päivitetty täsmällisyystieto ituradan tunnistuksen havainnoille.
Asiakirja nro 200025276 v00	Elokuu 2022	Ensimmäinen versio.

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patenti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

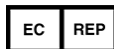
© 2022 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809.ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Rahoittaja Australiassa

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

Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).