

## Príbalový leták

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO  
LEN NA EXPORT

## Zamýšľané použitie

Prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx slúži na sekvenovanie knižníc DNA, ak sa používajú s testami na diagnostiku *in vitro* (IVD). Prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx je určený na použitie so špecifickými registrovanými, certifikovanými alebo schválenými IVD reagentami a analytickým softvérom.

## Zásady postupu

Prístroj Illumina® Nástroj NovaSeq 6000Dx je určený na sekvenovanie knižníc DNA pomocou diagnostických testov *in vitro*. Prístroj NovaSeq 6000Dx používa ako vstup knižnice vytvorené z DNA, kde sa indexy vzoriek a sekvencie zachytenia pridávajú k amplifikovaným cieľom. Knižnice vzoriek sa zachytávajú na prietokovom článku a sekvenčne sa spracujú v prístroji pomocou biochemického sekvenčného syntetického spracovania (SBS). Biochemická technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora (koncového činiteľa) deteguje fluorescenčne označené bázy s jedným nukleotidom počas ich začleňovania do rastúceho reťazca DNA. Softvér Real-Time Analysis (RTA) vykonáva analýzu obrazu a volanie bázy a ku každej báze za každý cyklus sekvenčného spracovania priradí kvalitatívne skóre. Po dokončení primárnej analýzy je v dodanom a povinnom prístroji Server Illumina DRAGEN pre prístroj NovaSeq 6000Dx možné spustiť sekundárnu analýzu na spracovanie primárnej analýzy báz. Prístroj NovaSeq 6000Dx využíva v závislosti od pracovného toku rôzne aplikácie sekundárnej analýzy. V prípade aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx spracovanie zahŕňa demultiplexáciu, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie, analýzu variantu a generovanie súborov formátu analýzy variantu (VCF a gVCF). Súbor VCF a gVCF obsahujú informácie o nájdených variantoch Germline alebo Somatic (v závislosti od zvoleného pracovného postupu) na špecifických pozíciách v referenčnom genóme.

## Duálny režim prevádzky

NovaSeq 6000Dx obsahuje pevný disk s jedným bootom so samostatnými režimami diagnostiky *in vitro* (IVD) a iba na výskumné použitie (RUO). Režim si vyberiete pomocou prepínača na obrazovke sekvenovania. Zvolený režim je jasne označený v rozhraní na všetkých obrazovkách. Analýzy sekvenovania IVD vrátane DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie v pracovných postupoch Germline a/alebo Somatic sa vykonávajú v režime IVD. V IVD režime je možné použiť iba reagenty na sekvenčné spracovanie IVD. Výkonnostné charakteristiky a obmedzenia postupu pre NovaSeq 6000Dx boli stanovené pomocou DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie v režime IVD.

## Obmedzenia postupu

1. Len na diagnostické použitie *in vitro*.
2. Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, ak sa používa s Súpravou reagentov NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súpravou reagentov NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov) je schopná dodať:
  - Výsledky sekvenovania:
    - $\geq 1,0$  terabáz (TBC) so súpravou S2
    - $\geq 3,0$  TB so súpravou S4
  - Dĺžka čítania (chod so spárovaným koncom)  $2 \times 150$  bázických párov (bp).
  - Bázy vyššie ako Q30  $\geq 85$  % pri dĺžke čítania  $2 \times 150$  bp. 85 % alebo viac primárnych analýz báz dosiahlo skóre kvality Phredovej stupnice viac ako 30, čo znamená, že správnosť primárnej analýzy báz je vyššia ako 99,9 %.
3. Dĺžka zavedení  $> 18$  bp a dĺžka delécií  $> 21$  bp neboli validované.
4. Veľké varianty vrátane multikleotidových variantov (MNV) a veľkých indelov sa môžu vo výstupnom súbore VCF vykazovať ako samostatné menšie varianty.
5. Malé MNV sa vo výstupnom súbore VCF uvádzajú ako samostatné varianty.
6. Delécie sa v súbore VCF vykážu na súradnici predchádzajúcej bázy podľa formátu VCF. Preto v prípade susediacich variantov treba pred vykazovaním zvážiť, či je každá primárna analýza báz homozygotnou referenciou.
7. Obmedzenia špecifické pre modul Germline:
  - Prístroj NovaSeq 6000Dx používajúci postupy analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navrhnutý tak, aby poskytoval kvalitatívne výsledky analýz variantov Germline (t.j. homozygotné, heterozygotné, štandardné).
  - Variácia v počte kópií môže ovplyvniť to, či sa variant identifikuje ako homozygotný alebo heterozygotný.
  - Systém nebude hlásiť viac ako dva varianty na jednom mieste, a to ani v prítomnosti variácie počtu kópií.
8. Obmedzenia špecifické pre modul Somatic:
  - Prístroj NovaSeq 6000Dx používajúci postupy analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navrhnutý tak, aby poskytoval kvalitatívne výsledky analýz variantov Somatic (t.j. prítomnosť variantov Somatic).
  - Pracovný postup analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF nedokáže rozlišovať medzi Germline a Somatic variantmi. Pracovný postup je určený na detekciu variantov v celom rozsahu frekvencií variantov, frekvenciu variantov však nie je možné použiť na odlíšenie Somatic variantov od Germline variantov.
  - Normálne tkanivo vo vzorke ovplyvňuje detekciu variantov. Vykazovaný limit detekcie je založený na frekvencii variantov vzhľadom na celkovú DNA extrahovanú z nádorového aj normálneho tkaniva.

- Ak sa na rovnakom mieste analyzuje viac ako jedna variantná alela, žiadna z alel nebude hlásená ako prechádzajúci variant. Namiesto toho bude hlásená celá množina alel, ale filtrovaná cez multialelický tag.

## Postupy kontroly kvality

Softvér NovaSeq 6000Dx hodnotí každý cyklus, vzorku a primárnu analýzu báz podľa metriky kontroly kvality. Počas prípravy knižnice sa odporúčajú pozitívne a negatívne kontroly, ktoré by sa mali zhodnotiť. Hodnotenie kontrol vykonajte podľa nasledujúceho postupu:

- Negatívna kontrola (kontrola bez šablóny) alebo iná negatívna kontrola – musí generovať očakávaný výsledok. Ak negatívna kontrola generuje výsledok odlišný od očakávaného výsledku, vyskytla sa pravdepodobná chyba sledovania vzorky, nesprávny záznam indexovacích primérov alebo došlo ku kontaminácii.
- Pozitívna kontrolná vzorka – musí generovať očakávaný výsledok. Ak pozitívna kontrola generuje výsledok odlišný od očakávaného výsledku, vyskytla sa pravdepodobná chyba sledovania vzorky alebo nesprávneho záznamu indexovacích primérov.

## Komponenty produktu

Zariadenie Illumina NovaSeq 6000Dx sa skladá z nasledujúcich súčastí:

1. Nástroj NovaSeq 6000Dx (Katalógové číslo 20068232)
2. Softvérové komponenty prístroja Nástroj NovaSeq 6000Dx vrátane:

Softvérová aplikácia	Miesto inštalácie	Funkcia	Popis
Operačný softvér NovaSeq	NovaSeq 6000Dx	Slúži na ovládanie prevádzky prístroja	Aplikácia Operačný softvér NovaSeq (NVOS) slúži na správu používania prístroja počas sekvenčného spracovania a generuje obrázky na použitie softvérom Real-Time Analysis (RTA).
Softvér Real-Time Analysis (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Slúži na vykonávanie primárnej analýzy	Softvérová aplikácia RTA konvertuje obrázky generované systémom NVOS pre každú dlaždicu na každý cyklus chodu sekvenovania na súbory primárnej analýzy báz. Súbory primárnej analýzy báz sú vstupy pre moduly aplikácie na Server Illumina DRAGEN pre prístroj NovaSeq 6000Dx. Softvérová aplikácia RTA neobsahuje používateľské rozhranie.
Správca chodu spoločnosti Illumina	Server Illumina DRAGEN	Riadi nastavenie a správu chodu	Správca chodu spoločnosti Illumina spravuje používateľov a prístroje, hosťuje aplikačný softvér a umožňuje používať hardvérové moduly urýchľovanej genómovej sekundárnej analýzy DRAGEN.

## Prevádzkové podmienky

Ďalšie informácie o prevádzkových podmienkach nájdete v časti Informácie o životnom prostredí v príručke na prípravu pracoviska so systémom *Produktová dokumentácia k prístroju NovaSeq 6000Dx*.

Prvok	Špecifikácia
Teplota	V laboratóriu uchovávajte teplotu 19 °C až 25 °C (22 °C ±3 °C). Toto je prevádzková teplota prístroja. Počas prevádzky nedovoľte zmenu teploty prostredia o viac ako ±2 °C.
Vlhkosť	Udržujte nekondenzujúcu relatívnu vlhkosť v rozmedzí 20–80 %. Prevádzka systému by mala prebiehať vo výške do 2 000 metrov.

## Spotrebný materiál a zariadenia

V tejto časti je uvedené všetko potrebné na cyklus sekvenovania NovaSeq 6000Dx. To zahŕňa Illumina dodaný spotrebný materiál a doplnkový spotrebný materiál a zariadenia, ktoré musíte kúpiť od iných dodávateľov. Tieto položky sú potrebné na ukončenie protokolu a vykonanie postupov údržby a riešenia problémov.

Informácie o symboloch na spotrebnom materiáli alebo balení spotrebného materiálu nájdete v časti [Kľúč symbolov prístroja IVD Illumina \(dokument č. 1000000039141\)](#).

## Spotrebný materiál sekvenovania

Počas NovaSeq 6000Dx cyklu sú potrebné nasledujúce komponenty:

- Kazeta s pufrom
- Klastrová kazeta
- Prietokový článok
- Skúmavka knižnice
- SBS kazeta

Spotrebný materiál NovaSeq 6000Dx je zabalený v nasledujúcich konfiguráciách. Každý komponent používa na presné sledovanie spotrebného materiálu a kompatibilitu rádiových frekvencií identifikáciu (RFID).

Tabuľka 1 Illumina-Dodaný spotrebný materiál

Názov súpravy	Obsah	Illumina Katalógové číslo
Súprava reagencií NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov)	Klastrová kazeta S2 Prietokový článok S2 Kazeta S2 SBS	20046931
Súprava reancií NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov)	Klastrová kazeta S4 Prietokový článok S4 Kazeta S4 SBS	20046933
NovaSeq 6000Dx Kazeta S2 s pufrom	Kazeta S2 s pufrom	20062292
NovaSeq 6000Dx Kazeta S4 s pufrom	Kazeta S4 s pufrom	20062293
NovaSeq 6000Dx Skúmavka knižnice	Jedna skúmavka knižnice	20062290
NovaSeq 6000Dx Skúmavka knižnice, balenie 24 ks	24 skúmaviek knižnice	20062291

Po prijatí spotrebného materiálu komponenty okamžite uskladnite pri uvedenej teplote na zabezpečenie ich riadneho výkonu.



Tabuľka 2 NovaSeq 6000Dx Skladovanie súpravy

Spotrebný materiál	Množstvo	Teplota pri uskladnení	Dĺžka	Šírka	Výška
Prietokový článok	1	2 °C až 8 °C	27,7 cm	17 cm	3,8 cm
Klastrová kazeta	1	-25 °C až -15 °C	29,5 cm	13 cm	9,4 cm
SBS kazeta	1	-25 °C až -15 °C	30 cm	12,4 cm	11,2 cm
Kazeta s pufrom	1	15 °C až 30 °C	42,2 cm	20,6 cm	21,1 cm
Skúmovka knižnice	1	15 °C až 30 °C	4,1 cm	2,3 cm	12,4 cm

## Údaje o spotrebnom materiáli

Na identifikáciu kompatibilných súprav komponentov sú prietokové články a kazety označené symbolmi, ktoré zobrazujú režim súpravy.

Tabuľka 3 Označenie kompatibility

Režim súpravy	Označenie na štítku	Popis
Komponenty súpravy S2		Prietokový článok S2 generuje až 4,1 miliardy samostatných čítaní prechádzajúcich cez filter s výstupom až do 1 000 Gb pri 2 x 150 bp. Prietokový článok S2 poskytuje rýchle sekvenovanie pre väčšinu aplikácií s vysokou priepustnosťou.
Komponenty súpravy S4		Prietokový článok S4 generuje až 10 miliárd samostatných čítaní prechádzajúcich cez filter s výstupom až do 3 000 Gb pri 2 x 150 bp. Prietokový článok S4 je štvorpruhová verzia prietokového článku navrhnutá pre maximálny výstup.

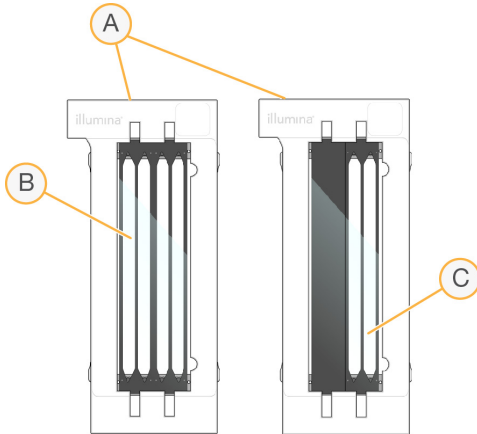
## Prietokový článok

Prietokový článok NovaSeq 6000Dx je vzorovaný prietokový článok uzavretý v kazete. Prietokový článok je substrát na báze skla obsahujúci miliardy nanojamôk v usporiadanom rozložení. V nanojamkách sa vytvárajú klastre, v ktorých následne prebehne sekvenovanie.

Každý prietokový článok má viacero pruhov na sekvenovanie združených knižníc. Prietokový článok S2 má dva pruhy a prietokový článok S4 má štyri. Každý pruh sa zobrazuje vo viacerých riadkoch a softvér potom rozdelí snímku každého riadka na menšie časti nazývané oblasti.

Malý počet škrabancov a iné menšie kozmetické chyby prietokového článku sú normálne a neočakáva sa, že by ohrozili kvalitu a výťažnosť údajov. Illumina odporúča používať tieto prietokové články ako zvyčajne.

Obrázok 1 Prietokové články



- A. Kazeta s prietokovým článkom
- B. Štvorpruhový prietokový článok (S4)
- C. Dvojpruhový prietokový článok (S2)

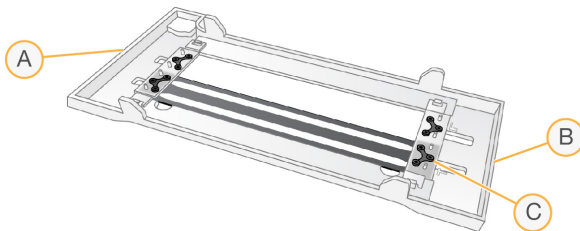
Spodná časť každého prietokového článku má viacero tesnení. Knižnice a reagencie vstupujú do pruhov prietokového článku cez tesnenia na vstupnom konci prietokového článku. Použité reagencie sú vytlačené z pruhov cez tesnenia na výstupnom konci.



## UPOZORNENIE

Pri manipulácii s prietokovým článkom sa nedotýkajte tesnení.

Obrázok 2 Prevrátený prietokový článok






- A. Výstupný koniec
- B. Vstupný koniec
- C. Tesnenie (jedno zo štyroch)

## Údaje o kazete s pufrom, klastrovej kazete a SBS kazete

Kazety s pufrom NovaSeq 6000Dx, klastrové kazety a SBS kazety majú fóliové zásobníky naplnené reagensiami, puframi a vymývacím roztokom. Klastrové a SBS kazety sú súčasťou NovaSeq 6000Dx súprav reagensíí. Kazeta s pufrom sa predáva samostatne.

Kazety sa vkladajú priamo do prístroja a sú farebne rozlíšené a označené, aby sa znížili chyby pri vkladaní. Vodiace prvky v chladiči s reagensiami a zásuvkách s pufrom zaisťujú správnu orientáciu.

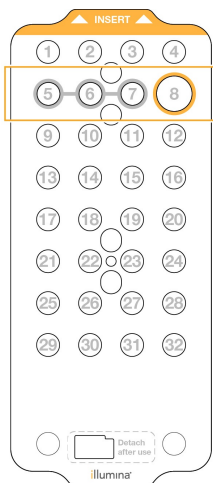
Tabuľka 4 Kazety NovaSeq 6000Dx

Spotrebný materiál	Popis
 Kazeta s pufrom	<p>Vopred naplnená puframi sekvenovania a váži do 6,8 kg. Plastová rukoväť uľahčuje prenášanie, nakladanie a vykladanie.</p> <p>Kazeta s pufrom obsahuje reagentie, ktoré sú citlivé na svetlo. Tento spotrebný materiál rozbaľte tesne pred jeho použitím.</p>
 Klastrová kazeta	<p>Vopred naplnená klastrovými indexovaciami reagensiami s dvojitými koncami a vymývacím roztokom. Zahŕňa určenú pozíciu pre skúmavku knižnice. Klastrovú kazetu od SBS kazety odlišuje oranžové označenie.</p> <p>Denaturačná reagentia v pozícii č. 30 obsahuje formamid, čo je organický amid a reprodukčný toxín. Bezpečnú likvidáciu akejkoľvek nepoužitej reagentie po cykle sekvenovania umožňuje vymeniteľný zásobník.</p>
 SBS kazeta	<p>Vopred naplnená sekvenčnými reagensiami v objemoch špecifických pre počet cyklov, ktoré táto súprava podporuje. Každá z troch pozícií reagensíí má príslušnú pozíciu vyhradenú pre automatické preplachovanie po dokončení chodu. SBS kazetu od klastrovej kazety odlišuje šedé označenie.</p> <p>SBS kazeta obsahuje reagentie, ktoré sú citlivé na svetlo. SBS kazetu rozbaľte až pred jej použitím.</p>

## Rezervované zásobníky klastrových kaziet

Pre vlastné primery sú rezervované tri zásobníky a pre skúmavku knižnice je rezervovaná jedna prázdna pozícia. Na účely sledovateľnosti vzorky sa skúmavka knižnice vkladá do klastrovej kazety počas nastavenia cyklu a zostáva v kazete až do konca chodu.

Obrázok 3 Očíslované zásobníky



Tabuľka 5 Zásobníky klastrových kaziet

Pozícia	Rezervované pre
5, 6, a 7	Voliteľné vlastné primery
8	Skúmvavka knižnice

## Spotrebný materiál a zariadenia dodávané používateľom

Tabuľka 6 Spotrebný materiál

Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
Centrifugačná fľaša, 500 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie Tween 20 pre údržbové preplachovanie.
Centrifugačná skúmavka, 30 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie NaOCl pre údržbové preplachovanie.
Jednorazové rukavice bez prášku	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Všeobecný účel.
Izopropylalkoholové utierky, 70 % alebo vlhčené utierky s obsahom etanolu, 70 %	VWR, katalógové č. 95041-714 alebo ekvivalent Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Čistenie komponentov pred cyklom a všeobecný účel.
Laboratórna utierka bez vlákien	VWR, katalógové č. 21905-026 alebo ekvivalent	Sušenie plošiny prietokového článku a všeobecný účel.
Stupeň reagensie NaOCl, 5 %	Sigma-Aldrich, katalógové č. 239305	Vykonanie údržbového preplachovania.
Špičky pipiet, 2 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie pipetou a vkladanie knižníc.
Špičky pipiet, 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie pipetou a vkladanie knižníc.



Spotrebný materiál	Dodávateľ	Účel
Špičky pipiet, 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie pipetou a vkladanie knižníc.
Špičky pipiet, 1 000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie pipetou a vkladanie knižníc.
Reagencia alebo izopropylalkohol spektrofotometrickej kvality (99 %), 100 ml fľaša	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Pravidelné čistenie optických komponentov a podpora kazety pri čistení objektívu.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalógové č. P7949	Vykonanie údržbového preplachovania.
Laboratórna voda	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá	Riedenie Tween 20 a chlórnan sodný na údržbové preplachovanie.

Tabuľka 7 Zariadenia

Položka	Zdroj
Mraznička, -25 °C až -15 °C	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Odmerný valec, 500 ml, sterilný	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vedierko na ľad	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipeta, 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipeta, 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipeta, 1 000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Chladnička, 2 °C až 8 °C	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoba, vodné kúpele*	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

\* Použite nádobu, do ktorej sa zmestia dve kazety s reagentami s príslušnou hladinou vody. Napríklad (61 cm × 91,4 cm × 25,4 cm).

## Usmernenia pre laboratórnú vodu

Na vykonávanie postupov na prístroji vždy používajte laboratórnú alebo deionizovanú vodu. Nikdy nepoužívajte kohútikovú vodu. Používajte len tieto stupne vody alebo ich ekvivalenty:

- Deionizovaná voda
- Illumina PW1
- Voda s odporom 18 megaohmov (MΩ)
- Voda Milli-Q
- Voda Super-Q
- Voda na molekulárnu biológiu

## Návod na použitie

Tento návod je určený na prevádzku Nástroj NovaSeq 6000Dx v režime IVD s použitím konfigurácií súpravy S2 alebo S4.

## Vytvoriť chod sekvenovania

Na vytvorenie chodu pomocou Správca chodu spoločnosti Illumina režimu IVD alebo RUO postupujte podľa nasledujúcich krokov. Prípadne vyberte možnosť **Import Run** (Importovať chod) na karte Planned (Plánované chody) na stránke Runs (Chody) a importujte vzorový hárok. Nové chody vytvorte buď v prístroji, alebo prístupom k Správca chodu spoločnosti Illumina pomocou prehliadača v sieťovom počítači.

**POZNÁMKA** Presné informácie požadované každou analytickou aplikáciou sa líšia, ale proces vytvorenia chodu zahŕňa nasledujúce kroky.

1. Na karte Planned (Plánované) na obrazovke Runs (Chody) vyberte možnosť **Create Run** (Vytvoriť chod).
2. Vyberte aplikáciu a potom kliknite na **Next** (Ďalej).
3. Prejdite cez obrazovky nastavení. V závislosti od vašej aplikácie môžu zobrazené obrazovky obsahovať:
  - **Run Settings** (Nastavenia chodu) – zadajte parametre chodu.
  - **Sample Data** (Údaje o vzorke) – zadajte údaje o vzorke manuálne alebo importovaním súboru CSV obsahujúceho informácie o vzorke. Názvy vzoriek musia byť jedinečné.
  - **Analysis settings** (Nastavenia analýzy) – zadajte nastavenia pre analýzu.
4. Na obrazovke Review (Kontrola) skontrolujte informácie o chode a vyberte možnosť **Save** (Uložiť). Chod bude pridaný do hornej časti zoznamu chodov na karte Planned (Plánované).

## Príprava spotrebného materiálu

Rozmrazte SBS a klastrové kazety



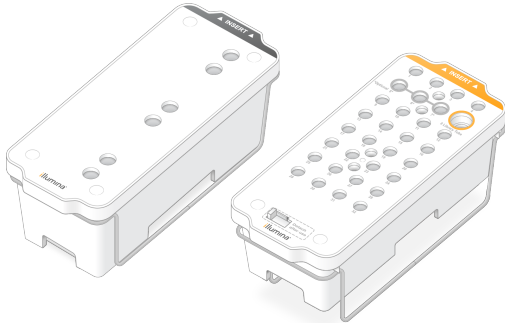
### UPOZORNENIE

Použitie horúcej vody na rozmrazovanie reagensov môže spôsobiť zníženú kvalitu údajov alebo zlyhanie chodu.

1. Ak prebieha sekvenovanie, po dokončení rozmrazovania skontrolujte, či sú dostupné obe strany nástroja.
2. Vyberte SBS a klastrové kazety z miesta uskladnenia s teplotou od  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

3. Každú kazetu vložte do drôteného stojana na rozmrazovanie. Stojany sa dodávajú s prístrojom a zabraňujú prevráteniu vo vodnom kúpeli.

Obrázok 4 Kazety v drôtených stojanoch na rozmrazovanie



4. Na určenie trvania rozmrazovania použite nasledujúcu tabuľku. SBS a klastrové kazety rozmrazujte vo vodnom kúpeli s izbovou teplotou (19 °C až 25 °C) podľa nasledujúcich pokynov. Ponorte kazety približne do polovice.

Kazeta	Trvanie rozmrazovania
Kazeta S2 SBS	4 hodiny
Klastrová kazeta S2	Do 2 hodín
Kazeta S4 SBS	4 hodiny
Klastrová kazeta S4	Do 4 hodín



#### UPOZORNENIE

Ak sa sekvenovanie nezačne do štyroch hodín od rozmrazenia kaziet s reagensiami, môže to mať za následok zníženú kvalitu údajov.

5. Podstavce kaziet dôkladne osušte papierovými utierkami. Vysušte aj priestor medzi jamkami, aby sa odstránila všetka voda.
6. Skontrolujte, či vo fóliových tesneniach nie je voda. Ak je v nich voda, osušte ich handričkou, ktorá nepúšťa vlákna.
7. Skontrolujte spodnú časť každej kazety a uistite sa, že v zásobníkoch nie je ľad, čo znamená, že reagensie sú rozmrazené.
8. Každú kazetu 10-krát prevráťte, aby ste reagensie zmiešali.



#### UPOZORNENIE

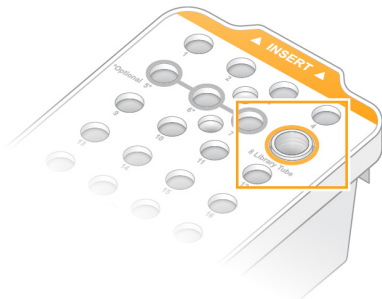
Ak kazety nepremiešate, môže to mať za následok zníženú kvalitu údajov.

9. Jemne poklepte spodnou časťou každej kazety o stôl, čím sa zníži množstvo vzduchových bubliniek.

## Vloženie skúmavky knižnice

1. Bez narušenia spodnej časti skúmavky knižnice vložte neuzavretú skúmavku obsahujúcu denaturovanú a zriedenú skupinu knižníc do pozície **Skúmavka knižnice** (č. 8) klastrovej kazety.
2. Vložte skúmavku knižnice do pozície č. 8 klastrovej kazety.

Obrázok 5 Skúmavka knižnice bez uzáveru vložená do pozície č. 8

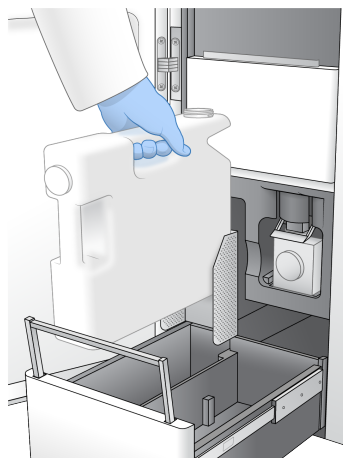


## Prázdne použité fľaše s reagensiami

Na vyprázdnenie fliaš s použitými reagensiami sa pri *každom* chode sekvenovania riadte nasledujúcimi pokynmi. Ak je váš systém nakonfigurovaný tak, aby smeroval použité reagensie externe, použité reagensie sa budú zhromažďovať v malej fľaši a pred každým cyklom sekvenovania ju musíte vyprázdniť. Veľká fľaša musí byť na svojom mieste.

1. Vyberte a vyprázdňte malú fľašu s použitými reagensiami podľa pokynov.
  - a. Zdvihnite páku a vyberte malú fľašu s použitými reagensiami z výklenku. Fľašu uchopte z oboch strán.
  - b. Odstráňte závitový uzáver z držiaka uzáveru na prednej strane fľaše.
  - c. Utesnite otvor fľaše uzáverom, aby ste zabránili úniku.
  - d. Obsah uchovávajte oddelene od obsahu druhej fľaše a zlikvidujte ho v súlade s normami platnými vo vašom regióne.
  - e. Fľašu bez uzáveru vráťte do výklenku a potom páku potiahnite dolu. Uzáver skladujte na držiaku uzáveru.
2. Vyberte a vyprázdňte veľkú fľašu s použitými reagensiami podľa pokynov.
  - a. Pomocou hornej rukoväte vyberte veľkú fľašu s použitými reagensiami z ľavej strany zásuvky pufra.
  - b. Odstráňte závitový uzáver z držiaka uzáveru na prednej strane fľaše.
  - c. Utesnite otvor fľaše uzáverom, aby ste zabránili úniku.
  - d. Obsah zlikvidujte v súlade s normami platnými vo vašom regióne. Pri vyprázdňovaní uchopte obe rukoväte.
  - e. Fľašu s uzáverom vráťte do zásuvky pufra. Uzáver skladujte na držiaku uzáveru.

Obrázok 6 Vrátenie prázdnej fľaše



3. Natiahnite si nový pár rukavíc bez prášku.

**UPOZORNENIE**

Po manipulácii s fľašou s použitými reagensiami vždy použite nový pár rukavíc.

4. Zatvorte zásuvku pufra a potom zatvorte dverka priehradky na tekutiny.

**UPOZORNENIE**

Ak použité fľaše s reagensiami nevyprázdnete, môže to mať za následok ukončenie chodu a pretečenie, čo vedie k poškodeniu prístroja a predstavuje bezpečnostné riziko.

## Príprava prietokového článku

1. Vyberte nové zabalené balenie prietokového článku z miesta, kde sa uchováva pri teplote 2 °C až 8 °C.
2. Utesnené balenie prietokového článku odložte na 10–15 minút pri teplote okolia (19 °C až 25 °C).  
Prietokový článok použite do 12 hodín od jeho vybalenia z obalu.

## Vloženie spotrebného materiálu

Pri spustení nastavenia cyklu a vložení spotrebného materiálu postupujte podľa nasledujúcich pokynov.

1. V hlavnej ponuke vyberte **Sequence (Sekvencia)**, potom vyberte cyklus jedného alebo dvoch prietokových článkov nasledujúcim spôsobom.
  - **A+B** – nastavte cyklus s dvomi prietokovými článkami.
  - **A** – nastavte cyklus s jedným prietokovým článkom na strane A.
  - **B** – nastavte cyklus s jedným prietokovým článkom na strane B.Systém spustí nastavenie cyklu, počnúc vložением prietokového článku.
2. Stlačením tlačidla **OK** potvrdíte varovanie a otvoríte dverka prietokového článku.

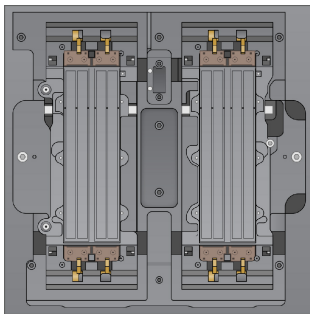
**UPOZORNENIE**

Počas cyklu sekvenovania udržiavajte povrch čistý a o prístroj sa neopierajte. Tlak na dvierka prietokového článku môže spôsobiť ich otvorenie, čo spôsobí zastavenie cyklu. Zastavené cykly nie je možné obnoviť.

**Vloženie prietokového článku**

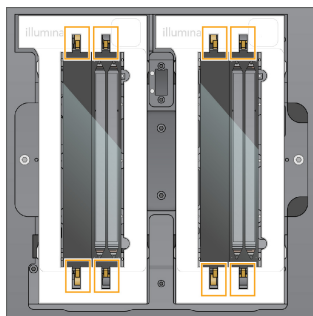
1. Vyberte prietokový článok z predchádzajúceho chodu, ak je prítomný.
2. Ak sú na plošine prietokového článku viditeľné častice, utierkou namočenou v alkohole očistite celú plošinu vrátane fluidného rozhrania a skleneného povrchu cieľa optického zarovnaní. Osušte handričkou, ktorá nepúšťa vlákna.

Obrázok 7 Plošina prietokového článku



3. Vytiahnite prietokový článok z obalu podľa pokynov.
  - a. Nasadte si nový pár rukavíc bez púdru, aby ste predišli kontaminácii skleneného povrchu prietokového článku.
  - b. Balenie položte na rovný povrch a odlepte fóliu z rohovej plôšky.
  - c. Odstráňte priehľadnú plastovú schránku zakrývajúcu prietokový článok.
  - d. Vytiahnite prietokový článok z obalu. Uchopte prietokový článok z obidvoch strán, aby ste sa nedotkli skla alebo spodného tesnenia.
  - e. Ak sú na niektorom zo sklenených povrchov viditeľné častice, vyčistite tento povrch handričkou napustenou alkoholom, ktorá nepúšťa vlákna, a vysušte ju pomocou laboratórneho obrúska, ktorý nepúšťa vlákna.
  - f. Obal primerane zlikvidujte.
4. Prietokový článok zarovnajte nad štyri vyvýšené svorky a umiestnite ho na plošinu.

Obrázok 8 Vložené prietokové články zarovnané nad svorkami



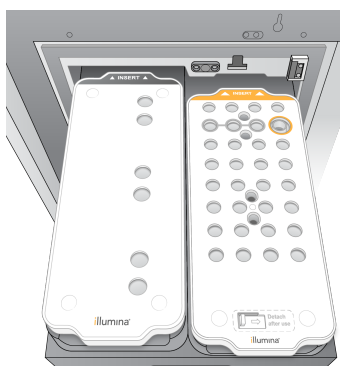
5. Vyberte **Close Flow Cell Door (Zatvoriť dverka prietokového článku)**.

Dvierka prietokového článku sa automaticky zatvoria, skontrolujú sa snímače a RFID a na obrazovke sa zobrazí ID prietokového článku.

## Vloženie SBS a klastrových kaziet

- Otvorte dverka priehradky na kvapalinu a potom otvorte dverka chladiča s reagensiami.
- Ak sa v prístroji nachádzajú použité SBS a klastrové kazety z predchádzajúceho chodu, vyberte ich. Použité kazety majú prepichnuté fóliové tesnenia.
- Nepoužitý obsah zlikvidujte v súlade s príslušnými predpismi. Informácie o bezpečnej likvidácii klastrovej kazety pozície č. 30 nájdete v časti [Odpojenie pozície č. 30 na strane 19](#).
- Prípravené kazety vložte do zásuvky chladiča s reagensiami podľa pokynov, aby štítky na vloženie smerovali k zadnej strane prístroja.
  - Umiestnite SBS kazetu (sivý štítok) do ľavej polohy.
  - Umiestnite klastrovú kazetu (oranžový štítok) obsahujúcu neuzatvorenú skúmavku knižnice do správnej polohy.

Obrázok 9 Vložené kazety s reagensiami



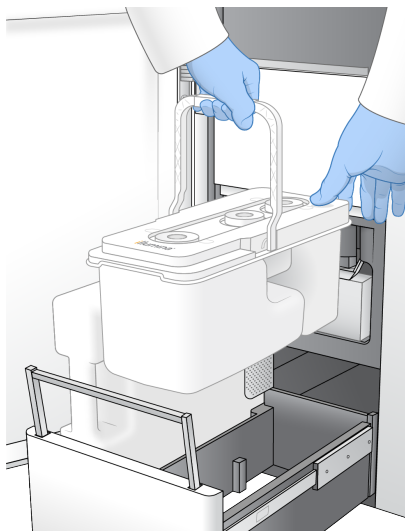
5. Zásuvku zasuňte do chladiča a potom zatvorte dverka chladiča s reagensiami.

Skontrolujú sa snímače a RFID. Na obrazovke sa zobrazia identifikátory skúmavky knižnice a dvoch kaziet.

## Vloženie kazety s pufrom

1. Potiahnite kovovú rukoväť a otvorte zásuvku na pufer.
2. Vyberte použitú kazetu s pufrom z pravej strany zásuvky na pufer.  
Použitá kazeta s pufrom má prepichnuté fóliové tesnenia.
3. Do zásuvky na pufer vložte novú kazetu s pufrom tak, aby Illumina štítok smeroval k prednej časti zásuvky.  
Zarovnajzte kazetu so zdvihnutými vodiacími lištami na spodku a bokoch zásuvky.  
Pri správnom vložení je kazeta s pufrom umiestnená rovnomerne a zásuvku je možné bez problémov zatvoriť.

Obrázok 10 Vloženie kazety s pufrom



4. Ak boli vyprázdnené obe použité fľaše s reagensiami, začiarknite políčko, ktoré potvrdzuje, že obe použité fľaše s reagensiami sú prázdne.

**POZNÁMKA** Ak použité fľaše s reagensiami nevyprázdnete, môže to mať za následok ukončenie chodu a pretečenie, čo vedie k poškodeniu prístroja a predstavuje bezpečnostné riziko.

5. Po pridaní spotrebného materiálu pokračujte výberom možnosti **Run Selection** (Výber chodu).

## Výber a spustenie chodu

Prístroj naskenuje ID skúmavky knižnice a vyhľadá zodpovedajúci plánovaný chod.

1. Ak systém pre každú používanú stranu objaví plánovaný chod zodpovedajúci ID skúmavky knižnice, výber chodu sa preskočí. Pokračujte výberom možnosti **Review** (Skontrolovať).
2. Ak neexistuje zhoda pre jednu alebo druhú stranu, vyberte možnosť **Run Selection** (Výber cyklu), potom vyberte jeden alebo viac plánovaných chodov.  
Na oboch stranách nie je možné vybrať rovnaký plánovaný chod.
3. Ak je zvolených jeden alebo viac chodov, vyberte položku **Pre-Run Checks** (Kontroly pred spustením).



- Počkajte približne 5 minút, kým sa kontrola pred spustením chodu dokončí.  
Chod sa spustí automaticky po úspešnom dokončení kontrol.

**POZNÁMKA** Aby ste predišli preplneniu pevného disku, po spustení chodu nekopírujte žiadne údaje do C:\.

## Chyby kontroly pred spustením chodu

- Ak budú kontroly pred spustením chodu neúspešné v dôsledku chyby snímača, napríklad ak nie je zistený prietokový článok, pracovný postup musíte ukončiť a znova spustiť.
- Pri iných neúspešných kontrolách pred spustením chodu vyberte možnosť **Retry** (Skúsiť znova), aby ste znovu spustili neúspešnú kontrolu alebo **Retry All** (Skúsiť znova všetko), aby ste znova spustili všetky kontroly.  
Chyby je potrebné pred spustením chodu vyriešiť.
- Ak chcete zobrazíť údaje o chybe, vyberte ikonu **Error** (Chyba).
- Ak zlyhá kontrola zarovnania, chybu vyriešite podľa pokynov.
  - Vyberte možnosť **Reload** (Znovu načítať) a potom vyberte možnosť **OK**, vďaka čomu sa vrátite na obrazovku Load (Načítať).
  - Odstráňte všetky položky z hornej časti prístroja a potom zvolte možnosť **OK**. Dvierka prietokového článku sa otvoria.
  - Znova načítajte prietokový článok a potom vyberte možnosť **Run Setup** (Nastavenie chodu).
  - Prejdite každou obrazovkou na opätovné načítanie každého RFID, aby ste sa vrátili na obrazovku Pre-Run Checks (Kontroly pred spustením chodu).
  - Zopakujte kontrolu.

## Monitorovanie priebehu chodu






Počas prebiehajúceho chodu sa na obrazovke sekvenovania zobrazia nasledujúce údaje. Obrazovka sekvenovania je prístupná prostredníctvom hlavnej ponuky.

- Stav jednotlivých krokov chodu**
- Time to completion** (Čas do ukončenia) – dátum a čas ukončenia chodu (rrrr-mm-dd hh:mm).
- Run progress** (Priebeh cyklu) – aktuálny krok chodu. Veľkosť indikátora priebehu nie je úmerná rýchlosti chodu každého kroku.
- Q-scores** (Q-skóre) – zobrazuje rozdelenie kvalitatívneho skóre (Q-skóre).
- Intensity** (Intenzita) – zobrazuje hodnotu intenzity klastrov 90. percentilu každej dlaždice. Farby grafu označujú červené a zelené kanály.
- Clusters passing filter (%)** (Klastre prechádzajúce filtrom [%]) – zobrazuje percento klastrov prechádzajúcich filtrom.

- **Projected Total Yield (GB)** (Predpokladaná celková výťažnosť [GB]) – predpokladaná výťažnosť v rámci chodu prietokového článku. Ak sú zvolené metriky pre jednotlivé pruhy (H), zobrazené čísla označujú aktuálnu výťažnosť jedného pruhu a aktualizujú sa pri každom cykle počas celého chodu.
- **Q30** – percento primárnej analýzy báz každého chodu s Q-skóre  $\geq 30$ .

## Ikony stavu

Ikona stavu na NVOS rozhraní označuje stav chodu. Číslo na ikone označuje počet podmienok pre daný stav. Keď sa zmení stav chodu, ikona začne blikať. Po stlačení ikony sa zobrazí popis stavu. Výberom možnosti **Acknowledge** (Potvrdiť) vymažete hlásenie a následným výberom možnosti **Close** (Zatvoriť) zatvoríte dialógové okno.

Ikona stavu	Názov stavu	Popis
	Stav v poriadku	Systém funguje normálne.
	Spracovanie	Systém vykonáva spracovanie.
	Varovanie	Zobrazilo sa varovanie, ktoré si vyžaduje pozornosť. Pri varovaniach sa chod nezastaví ani sa pred spracovaním nevyžaduje žiadna akcia.
	Chyba	Vyskytla sa chyba. Chyby je potrebné vyriešiť pred pokračovaním chodu.
	Informácie	K dispozícii je nekritické hlásenie.

## Spustenie metrick

Softvér zobrazuje metriky vygenerované počas chodu. Metriky sa zobrazujú v podobe grafov, diagramov a tabuliek založených na údajoch vygenerovaných softvérom RTA3 a zapísaných do súborov InterOp.

Klastrovanie trvá približne 2 hodiny, potom sa 1. cyklom začína sekvenovanie. Metriky sa v priebehu sekvenovania aktualizujú. Klastre, ktoré prechádzajú filtrom, výťažnosť a kvalitatívne skóre sú dostupné po 26. cykle. Pred 26. cyklom nebudú automaticky vyplnené žiadne hodnoty, ktoré budú označené ako nerelevantné.

## Po sekvenovaní

V nasledujúcich častiach sú uvedené pokyny týkajúce sa krokov uskutočnených po dokončení sekvenovania.

## Automatické prepláchnutie po ukončení chodu

Po dokončení sekvenovania softvér spustí automatické prepláchnutie po ukončení chodu, ktoré trvá približne 80 minút. Systém načerpá 0,24 % chlórnanu sodného (NaOCl) z pozície č. 17 a nariedi ho na 0,12 %. 0,12 % NaOCl sa prečerpá do pozície s reagensiami ExAmp a pozície knižnice, cez prietokový článok a potom do použitých fľaš s reagensiami. Pri preplachovaní sa zo systému vymyje šablóna, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii.

Po dokončení prepláchnutia sa systém prepne do bezpečného stavu a aktivuje sa tlačidlo Home (Domov). Spotrebný materiál ponechajte na mieste až do ďalšieho cyklu. Po prepláchnutí zostanú nasávacie trubičky v SBS a klastrových kazetách, aby sa zabránilo vniknutiu vzduchu do systému. Nasávacie trubičky v kazete s pufrom sa zdvihnú, takže použité fľaše s reagensiami je možné vyprázdniť. Čistiaci pufer sa potom prečerpá cez všetky vedenia na odstránenie NaOCl a reagensii zo systému.

**POZNÁMKA** Ak sa počas automatického prepláchnutia po ukončení chodu vyskytne chyba a ak je neúplné, bude potrebné vykonať údržbové čistenie.

## Odpojenie pozície č. 30

Zásobník v pozícii č. 30 klastrovej kazety obsahuje formamid. Musí sa vybrať z použitej klastrovej kazety a samostatne zlikvidovať.



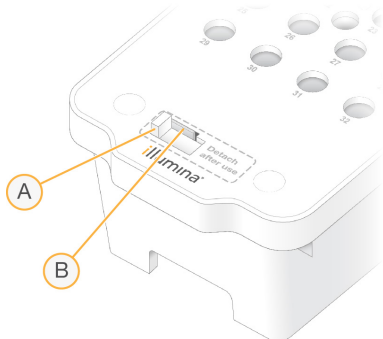
### UPOZORNENIE

**Táto súprava reagentov obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášťa, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na karte bezpečnostných údajov na stránke [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

1. Rukami v rukaviciach zatlačte bielu plastovú plôšku s označením **Odpojiť po použití** smerom doprava.
2. Položte ruku alebo pevný povrch pod zásobník a zatlačte priehľadnú plastovú plôšku smerom k Illuminaštitku, aby ste uvoľnili zásobník spod klastrovej kazety.

**POZNÁMKA** Pri skladovaní klastrovej kazety nepokladajte na seba. Pokladanie na seba môže spôsobiť náhodné odpojenie zásobníka.

Obrázok 11 Vymeniteľná pozícia č. 30



- A. Biela plastová plôška na odpojenie
- B. Priehľadná plastová plôška na uvoľnenie

3. Zásobník zlikvidujte v súlade s platnými normami.

## Výsledky sekvenovania

Počas sekvenovania sa údaje automaticky prenesú z Nástroj NovaSeq 6000Dx do Server Illumina DRAGEN. Po dokončení primárnej analýzy a dokončení prenosu údajov môže sekundárna analýza v systéme Server Illumina DRAGEN začať automaticky použitím možností analýzy definovaných aplikáciou, ktorú zvolíte v Správca chodu spoločnosti Illumina. Vytvorené výsledky závisia od možností zvolených počas nastavenia chodu. Ak chcete zobraziť výsledky z chodu, vyberte požadovaný názov chodu na karte Completed (Dokončené) na obrazovke Runs (Chody). Výstupné súbory môžete nájsť aj na stránke uvedenej na obrazovke Instrument Settings (Nastavenia prístroja).

## Analýza v reálnom čase

Nástroj NovaSeq 6000Dx spustí RTA3, implementáciu softvéru Analýza v reálnom čase, v nástroji Compute Engine (CE). RTA3 extrahuje intenzity z obrázkov získaných z fotoaparátu, vykoná primárnu analýzu báz, priradí kvalitatívne skóre primárnym analýzám báz, zarovná sa k PhiX a bude hlásiť údaje v súboroch InterOp.

Na optimalizáciu času spracovania RTA3 uloží informácie do pamäte. Ak je RTA3 ukončené, spracovanie sa neobnoví a všetky údaje spracúvané v pamäti sa stratia.

### Vstupy RTA3

RTA3 vyžaduje obrázky dlaždíc obsiahnuté v lokálnej systémovej pamäti na spracovanie. RTA3 prijme informácie o chode a príkazy z NVOS.

## Výstupy RTA3

Snímky z každého farebného kanála sa do pamäte presúvajú RTA3 ako dlaždice. Z týchto snímok sa v aplikácii RTA3 vytvorí výstup v podobe skupiny súborov primárnej analýzy báz s posúdením kvality a súborov filtrov. Všetky ostatné výstupy podporujú výstupné súbory.

Typ súboru	Popis
Súbory primárnej analýzy báz	Každá dlaždica, ktorá sa analyzuje, je zahrnutá v súbore zlúčenej primárnej analýzy báz (*.cbcl). Dlaždice z rovnakého pruhu a povrchu sú zoskupené do jedného súboru CBCL pre každý pruh a povrch.
Súbory filtrov	Každá dlaždica vytvorí súbor filtra (*.filter), ktorý špecifikuje, či klaster prechádza filtermi.

RTA3 poskytuje metriky kvality cyklu v reálnom čase uložené ako súbory InterOp, čo sú binárne výstupy obsahujúce metriky dlaždíc, cyklov a úrovne načítania.

## Riešenie chýb

RTA3 vytvorí súbory denníka a zapíše ich do priečinka Logs (Záznamy). Chyby sa zaznamenajú do textového súboru vo formáte \*.log.

Nasledujúce súbory denníkov sa prenású do konečného výstupného miesta na konci spracovania:

- `info_00000.log` zhrnie dôležité udalosti chodu.
- `error_00000.log` uvádza zoznam chýb, ku ktorým došlo počas chodu.
- `warning_00000.log` uvádza zoznam varovaní, ku ktorým došlo počas chodu.

## Dlaždice prietokového článku

Dlaždice sú malé zobrazovacie plochy na prietokovom článku. Fotoaparát zhotoví jednu snímku každého riadka, ktorú softvér rozdelí na dlaždice na RTA3 spracovanie. Celkový počet dlaždíc závisí od toho, koľko pruhov, riadkov a povrchov sa zobrazuje na prietokovom článku.

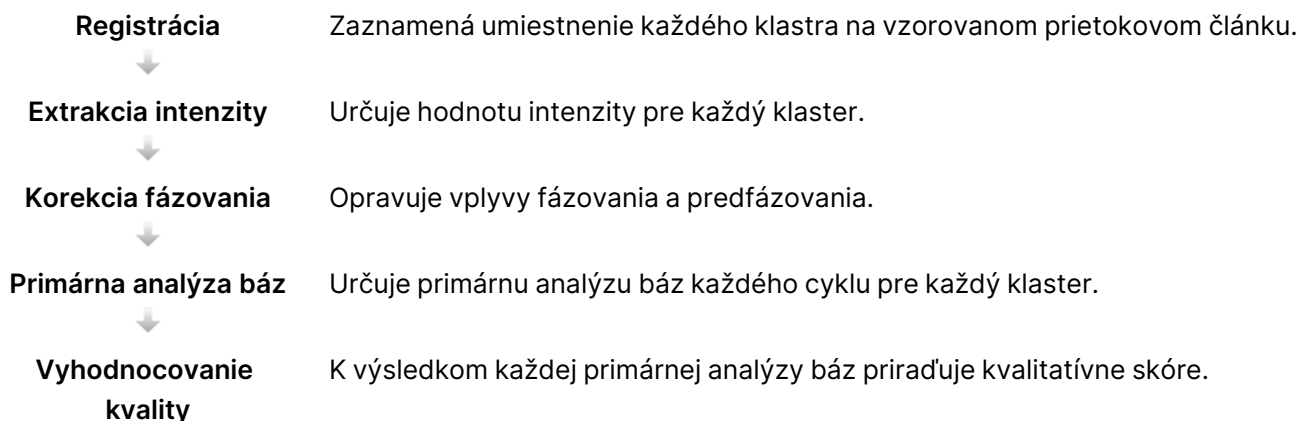
- Prietokové články S2 majú celkovo 1 408 dlaždíc.
- Prietokové články S4 majú celkovo 3 744 dlaždíc.

Komponent prietokového článku	S2	S4	Popis
Pruhy	2	4	Pruh je fyzický kanál so vstupnými a výstupnými portmi.
Plochy	2	2	Prietokové články S2 a S4 sú zobrazované na dvoch povrchoch: hornom a dolnom. Najprv sa zobrazí horný povrch dlaždice.
Počet riadkov na pruh	4	6	Riadok je stĺpec v pruhu prietokového článku, ktorý fotoaparát zaznamená ako jeden nasnímaný obrázok.
Dlaždice v každom riadku	88	78	Dlaždica je časť riadka, ktorá znázorňuje zobrazenú oblasť na prietokovom článku.
Celkový počet vygenerovaných dlaždíc	1 408	3 744	Pruhy × povrchy × riadky × dlaždice na riadok sa rovnajú celkovému počtu dlaždíc.

Názov dlaždice je päťciferné číslo, ktoré predstavuje pozíciu dlaždice na prietokovom článku. Napríklad názov dlaždice 1\_1205 označuje pruh 1, horný povrch, riadok 2, dlaždicu 5.

- Prvá číslica označuje číslo pruhu:
  - 1 alebo 2 pre prietokový článok S2.
  - 1, 2, 3 alebo 4 pre prietokový článok S4.
- Druhá číslica predstavuje povrch: 1 pre hornú alebo 2 pre spodnú časť.
- Tretia číslica predstavuje číslo riadka:
  - 1, 2, 3 alebo 4 pre prietokový článok S2.
  - 1, 2, 3, 4, 5 alebo 6 pre prietokový článok S4.
- Posledné dve číslice predstavujú číslo dlaždice. Číslovanie začína číslom 01 na výstupe prietokového článku do 88 alebo 78 na vstupnom konci.
  - 01 až 88 pre prietokový článok S2.
  - 01 až 78 pre prietokový článok S4.

## Pracovný postup analýzy v reálnom čase



### Registrácia

Registráciou sa zaručí obraz s otočeným štvorcovým poľom nanojamôk na vzorovanom prietokovom článku. Vzhľadom na usporiadané rozloženie nanojamiek sú súradnice X a Y pre každý klaster v dlaždici vopred určené. Pozície klastra sa zapíšu do súboru umiestnenia klastra (s.locs) pre každý cyklus.

Ak zlyhá zápis akejkoľvek snímky v cykle, v tomto cykle sa nevytvoria žiadne primárne analýzy báz pre túto dlaždicu.

### Extrakcia intenzity

Po registrácii sa pri extrakcii intenzity vypočíta hodnota intenzity pre každú nanojamku na danom obrázku. Ak bola registrácia neúspešná, nie je možné extrahovať intenzitu danej dlaždice.

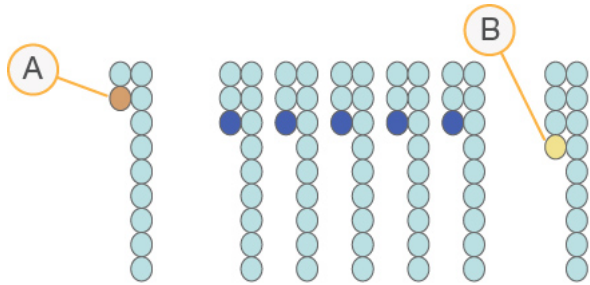
## Korekcia fázovania

Počas reakcie sekvenovania sa každé vlákno DNA v klasteri predĺži pri každom cykle o jednu bázu. K fázovaniu a predfázovaniu dochádza, keď sa vlákno dostane mimo fázy aktuálneho cyklu inkorporácie.

K fázovaniu dochádza, keď báza inkorporácie zostane vzadu.

K predfázovaniu dochádza, keď sa báza inkorporácie dostane dopredu.

Obrázok 12 Fázovanie a predfázovanie



- A. Čítanie s fázovanou bázou.
- B. Čítanie s predfázovanou bázou.

V aplikácii RTA3 sa napravia účinky fázovania a predfázovania, čím sa zvýši kvalita údajov v rámci každého cyklu počas chodu.

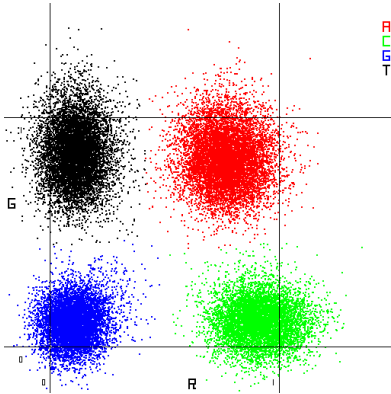
## Primárna analýza báz

Pri primárnej analýze báz sa určuje báza (A, C, G alebo T) pre každý klaster danej oblasti v konkrétnom cykle. Prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx používa dvojkanálové sekvenovanie, ktoré na kódovanie údajov štyroch DNA báz vyžaduje len dve snímky: jednu zo zeleného kanála a druhú z červeného kanála.

Žiadna analýza sa označuje ako N. K žiadnym analýzám dochádza, ak klaster neprejde filtrom, zlyhá registrácia alebo sa klaster posunie mimo obrázok.

Intenzity každého klastra sa extrahujú z červených a zelených obrázkov a porovnajú sa navzájom, čo vedie k štyrom odlišným populáciám. Každá populácia zodpovedá jednej báze. Pri primárnej analýze báz sa určuje, do ktorej populácie patria jednotlivé klastre.

Obrázok 13 Vizualizácia intenzít klastrov



Tabuľka 8 Primárna analýza báz v dvojkanálovom sekvenovaní

Báza	Červený kanál	Zelený kanál	Výsledok
A	1 (zapnuté)	1 (zapnuté)	Klastre, ktoré vykazujú svetelnú intenzitu v červenom aj zelenom kanáli.
C	1 (zapnuté)	0 (vypnuté)	Klastre, ktoré vykazujú svetelnú intenzitu iba v červenom kanáli.
G	0 (vypnuté)	0 (vypnuté)	Klastre, ktoré nevykazujú žiadnu svetelnú intenzitu v známom umiestnení klastra.
T	0 (vypnuté)	1 (zapnuté)	Klastre, ktoré vykazujú intenzitu len v zelenom kanáli.

## Filtrovanie klastrov

Aplikácia RTA3 počas chodu filtruje nespracované údaje, čím sa odstraňujú čítania sekvencie, ktoré nespĺňajú prah kvality stanovený pre údaje. Prekrývajúce sa klastre a klastre s nízkou kvalitou sa odstraňujú.

Pri dvojkanálovej analýze aplikácia RTA3 využíva na určenie čistoty (meranie čistoty intenzity) primárnej analýzy báz systém založený na populáciách. Klastre prejdú filtrom (PF), ak je čistota nižšia, ako pevne stanovený prah, maximálne pri jedinej primárnej analýze báz počas prvých 25 cykloch. Zarovnanie podľa PhiX, ak je súčasťou, sa vykonáva v 26. cykle na podskupine oblastí pre klastre, ktoré prešli filtrom. Klastre, ktoré neprejdú filtrom, neprechádzajú primárnou analýzou báz a nie sú zarovnané.

## Kvalitatívne skóre

Kvalitatívne skóre (Q-skóre) je predpoveď pravdepodobnosti nesprávnej primárnej analýzy báz. Vyššie Q-skóre znamená, že kvalita primárnej analýzy báz je vyššia a je pravdepodobnejšie, že výsledky budú správne. Po určení Q-skóre sa výsledky zaznamenávajú v súboroch CBCL.

Q-skóre stručne označuje malé pravdepodobnosti chýb. Kvalitatívne skóre sú vyjadrené ako  $Q(X)$ , kde je  $X$  hodnota skóre. V nasledujúcej tabuľke je zobrazený vzťah medzi kvalitatívnym skóre a pravdepodobnosťou chyby.



Q-skóre Q(X)	Pravdepodobnosť chyby
Q40	0,0001 (1 z 10 000)
Q30	0,001 (1 z 1 000)
Q20	0,01 (1 z 100)
Q10	0,1 (1 z 10)

## Vyhodnocovanie kvality a podávanie správ

Kvalitatívnym vyhodnocovaním sa vypočíta súbor prediktorov pre každú primárnu analýzu báz a potom sa pomocou hodnôt prediktorov vyhledá Q-skóre v tabuľke kvality. Tabuľky kvality sú vytvorené tak, aby poskytovali optimálne presné kvalitatívne predpovede pre chody generované špecifickou konfiguráciou platformy sekvenovania a verzie chemických procesov.

Kvalitatívne vyhodnocovanie je založené na upravenej verzii algoritmu Phred.

Na generovanie Q-tabuľky pre Nástroj NovaSeq 6000Dx boli určené tri skupiny primárnych analýz báz na základe zoskupenia týchto špecifických prediktívnych funkcií. Po zoskupení primárnych analýz báz bola priemerná miera chyby vypočítaná empiricky pre každú z troch skupín a príslušné Q-skóre bolo zaznamenané v Q-tabuľke spolu s prediktívnymi funkciami korelujúcimi s danou skupinou. Ako také sú možné iba tri Q-skóre s RTA3 a toto Q-skóre predstavuje priemernú chybovosť skupiny. Celkovo to vedie k zjednodušenému, no zároveň vysoko presnému hodnoteniu kvality. Tri skupiny v tabuľke kvality zodpovedajú hraničným (< Q15), stredným (~Q20) a vysokokvalitným (> Q30) primárnym analýzám báz a je im priradené konkrétne skóre 12, 26 a 34. Okrem toho je nulové skóre 2 priradené všetkým procesom, ktoré nie sú analýzy. Tento model vykazovania Q-skóre znižuje požiadavky na úložný priestor a šírku pásma bez ovplyvnenia presnosti alebo výkonu.

Obrázok 14 Zjednodušené Q-skóre s RTA3





## Výstupné súbory sekvenovania

Typ súboru	Opis, umiestnenie a názov súboru
Súbory primárnej analýzy báz	Každý analyzovaný klastor je zahrnutý do súboru primárnej analýzy báz agregovaného do jedného súboru na cyklus, pruh a povrch. Agregovaný súbor obsahuje výsledky primárnej analýzy báz a zakódované kvalitatívne skóre pre každý klastor. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, napríklad L001_1.cbcl
Súbory umiestnení klastrov	V rámci každého prietokového článku obsahuje súbor umiestnenia binárneho klastra súradnice XY vzhľadom na klastre v dlaždici. Šesťuholníkové rozloženie, ktoré sa zhoduje s nanojamkovým rozložením prietokového článku, predefinuje tieto súradnice. Data\Intensities s_[lane].locs
Súbory filtrov	Súbor filtra špecifikuje, či klastor prešiel filtermi. Súbory filtrov sa generujú v 26. cykle na základe údajov z 25 cyklov. Pre každú dlaždicu sa vytvorí jeden súbor filtra. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Súbor s informáciami o chode	Sú v ňom uvedené informácie zahŕňajúce názov chodu, počet cyklov v každom čítaní, informácie o tom, či je čítanie indexované (Index Read), a počet riadkov a dlaždíc na prietokovom článku. Súbor s informáciami o chode sa vytvára na začiatku chodu. [Root folder],RunInfo.xml
Súbory miniatúr	Obrázky miniatúr pre prvý cyklus každého sekvenovaného čítania. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]–súbory sú uložené v podpriechniku v rámci každého cyklu. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg – Obrázok miniatúry obsahuje aj názov oblasti.

## Štruktúra výstupného priečinka sekvenovania

Softvér NIVOS automaticky vygeneruje názov výstupného priečinka.

 **Config** – nastavenie konfigurácie pre chod.


 **Logs** – súbory denníka s informáciami o analytike prístroja, prevádzkových krokoch a RTA3 udalostiach.

 SampleSheet.csv – vzorový hárok alebo iný priložený súbor, ak je k dispozícii.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]** – súbory primárnej analýzy báz (\*.cbcl) zoskupené do jedného súboru na jeden pruh, povrch a cyklus.

 s.locs – súbor umiestnenia klastra v rámci chodu.

 **InterOp** – binárne súbory.

 **Recipe** – súbor s predpisom pre konkrétny chod.

 **Thumbnail Images** – obrázky miniatúr pre každú 10. dlaždicu.

 **LIMS** – súbor nastavenia cyklu (\*.json), ak je k dispozícii.

 **Audit**

- 📄 AuditInfo.xml
- 📄 RTA3.cfg
- 📄 RunInfo.xml
- 📄 RunParameters.xml
- 📄 RTAComplete.txt
- 📄 CopyComplete.txt
- 📄 SequenceComplete.txt
- 📄 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt
- 📄 Manifest.tsv

## Varovania a preventívne opatrenia



### UPOZORNENIE

Federálne zákony obmedzujú predaj, objednanie, používanie alebo objednanie používania tohto zariadenia na lekára alebo iného odborníka s licenciou podľa práva štátu, v ktorom vykonáva prax.

- **Niektoré komponenty reagensí poskytované spoločnosťou Illumina na použitie s prístrojom Nástroj NovaSeq 6000Dx obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštia, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi.** Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
- Nedodržovanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality vzoriek.
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a sadami reagensí noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami zo súpravy si dôkladne umyte ruky.
- Dodržiavajte správne laboratórne postupy a dobrú laboratórnu hygienu, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, nástrojov a genomických vzoriek DNA produktmi PCR. Kontaminácia spôsobená PCR môže zapríčiniť nepresné a nespoľahlivé výsledky.
- Aby nedošlo ku kontaminácii, priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia mať špecializované vybavenie a spotrebný materiál (napríklad pipety, špičky pipiet, mixéry a odstredivky).

- Párovanie indexu so vzorkou sa musí presne zhodovať s rozložením indexového štítku. Aplikácia DNA Prep with Enrichment automaticky vyplní indexové priméry spojené s názvami vzoriek po zadaní počas nastavenia chodu. Pred začatím cyklu sekvenčného spracovania odporúčame, aby používateľ overil priradenie indexovacích primérov ku vzorkám. Nezhoda medzi vzorkami a rozložením plošiny vedie k strate identifikácie pozitívnej vzorky a k nesprávnemu vykazovaniu výsledkov.
- Na ochranu počítača pred vírusmi odporúčame inštalovať používateľom zabezpečený antivírusový softvér.
- Ak je odpojený akýkoľvek panel, prístroj NovaSeq 6000Dx nepoužívajte. Ak bol ktorýkoľvek z panelov odstránený, pri použití prístroja vzniká riziko potenciálneho vystavenia sieťovému napätiu a jednosmernému napätiu.
- Nedotýkajte sa plošiny prietokového článku v priestore na prietokový článok. Teplota ohrievača v tomto priestore dosahuje 22 °C až 95 °C – hrozí riziko popálenia.
- Hmotnosť prístroja je približne 1059 libier a ak spadne alebo sa s ním nesprávne manipuluje, môže spôsobiť vážne poranenie.

## Výkonnostné charakteristiky

Výkonnostné charakteristiky prístroja NovaSeq 6000Dx boli stanovené pomocou softvéru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na prípravu knižnice, Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov) na sekvenovanie a DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie na sekundárnu analýzu vrátane detekcie variantov Germline a Somatic. Štúdie zahŕňali indexovanie vzoriek, prenos vzoriek, vstup DNA, analytickú citlivosť (limit blanku/detekčný limit), správnosť, presnosť, porovnanie metód a reprodukovateľnosť. Prečítajte si príbalový leták k prístroju *Príbalový leták k zariadeniu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx*, v ktorom nájdete informácie o charakteristikách účinnosti týkajúcich sa predanalytických faktorov, napríklad metódy extrakcie alebo rušivé látky.

## Definície výpočtov použitých v rámci charakteristík účinnosti

1. Pozitívna percentuálna zhoda (PPA) sa počíta ako pomer miest klasifikovaných ako varianty podľa referenčnej metódy, ktoré analýza správne vykáže.
  - $(\text{počet variantných miest správne vykazovaných analýzou}) / (\text{celkový počet variantných miest})$   
Variantné miesta vykazované analýzou, ktoré sa zhodujú (sú konkordantné) s referenčnou metódou, sú pravdivo pozitívne (TP). Variantné miesta vykazované analýzou ako referenčné analýzy alebo ako odlišné variantné analýzy sú nepravdivo negatívne (FN).
2. Negatívna percentuálna zhoda (NPA) sa počíta ako pomer miest klasifikovaných ako štandardné podľa referenčnej metódy, ktoré analýza správne vykáže.
  - $(\text{počet štandardných miest správne vykazovaných analýzou}) / (\text{celkový počet štandardných miest})$

Štandardné miesta vykazované analýzou, ktoré sa zhodujú (sú konkordantné) s referenčnou metódou, sú pravdivo negatívne (TN). Štandardné miesta vykazované analýzou ako varianty sú nepravdivo pozitívne (FP).

3. Celková percentuálna zhoda (OPA) sa počíta ako pomer miest, ktoré analýza správne vykazuje vzhľadom na referenčnú metódu.
  - $$\frac{((\text{počet variantných miest správne vykazovaných analýzou}) + (\text{počet štandardných miest správne vykazovaných analýzou}))}{((\text{celkový počet variantných miest}) + (\text{celkový počet štandardných miest}))}$$
4. Výpočty PPA, NPA a OPA nezahŕňajú žiadne volania (variantné alebo referenčné miesta nespĺňajú najmenej jeden filter kvality).
5. Percento pozitívnych analýz (PPC) je počet pozorovaní so zisteným variantom vydelený celkovým počtom testovaných pozorovaní okrem akýchkoľvek neplatných pozorovaní alebo tých, ktoré sú filtrované ako s nízkou hĺbkou.
6. Percento negatívnych analýz (PNC) sa vypočíta ako počet pozorovaní s prechodnou referenciou ako výsledok na pozícii vydelený celkovým počtom testovaných pozorovaní bez akýchkoľvek neplatných pozorovaní alebo tých, ktoré sú filtrované ako s nízkou hĺbkou.
7. Percento analyzovateľnosti autozómov sa vypočíta ako percento non-N referenčných pozícií v cieľových oblastiach v autozomálnych chromozómoch s prechodom genotypu.

## Indexovanie vzorky

Priméry indexu vzorky pridané počas prípravy knižnice priradujú ku každej DNA vzorky jedinečnú sekvenciu. Tieto jedinečné sekvencie umožňujú zoskupiť viacero vzoriek do jedného chodu sekvenovania. Indexovanie vzoriek sa používa pre pracovné postupy Germline aj Somatic. Účelom tejto štúdie bolo vytvoriť minimálny (12) a maximálny (192) počet vzoriek, ktoré je možné spracovať v rámci jedného cyklu sekvenčného spracovania prístrojom Nástroj NovaSeq 6000Dx. Uskutočnilo sa testovanie dvanástich jedinečných vzoriek DNA platinového genómu (NA12877–NA12888) s najmenej 12 odlišnými kombináciami indexovacieho priméru na jednu vzorku. Knižnice vzoriek boli pripravené pomocou reprezentatívnej analýzy určenej na dopytovanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz na všetkých 23 ľudských chromozómoch. Výsledky vzoriek zo štyroch chodov sekvenovania pomocou pracovného postupu analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx boli porovnané s verziou platinových genómov 2016-1.0.

Pre prvú sadu chodov bolo sekvenovaných 192 jedinečne indexovaných knižníc vzoriek v dvoch chodoch sekvenovania, po jednom s reagenciami S2 a S4, aby sa overil maximálny počet podporovaných indexov a schopnosť testu konzistentne vyžadovať genotypizáciu danej vzorky cez rôzne kombinácie indexovacích primérov. V prípade druhej množiny chodov bolo sekvenčne spracovaných 12 jedinečne indexovaných vzorových knižníc vo dvoch chodoch sekvenovania, jeden reagenciami S2 a druhý s reagenciami S4, na overenie minimálneho počtu podporovaných indexov.

Pri 192-indexových chodoch sa PPA pre SNV pohybovala od 99,7 % do 100 %, PPA pre zavedenia bola 100 %, PPA pre delécie bola v rozsahu od 96,7 % do 100 % a NPA bola 100 %. Pri 12-indexových chodoch sa PPA pre SNV pohybovala od 99,7 % do 100 %, PPA pre zavedenia bola v rozsahu od 89,6 % do 100 %, PPA pre delécie v rozsahu od 94,6 % do 100 % a NPA bola 100 %.

## Prenos vzorky

Prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx umožňuje sekvenčne spracovať viacero vzoriek a kontrol v rámci jedného chodu sekvenovania. Uskutočnila sa štúdia na hodnotenie rozsahu prenosu vzorky v rámci chodu sekvenovania (v rámci chodu) a medzi chodmi sekvenovania (medzi chodmi). Dvanásť vzoriek DNA platinového genómu, šesť mužských a šesť ženských, bolo testovaných reprezentatívnym testom navrhnutým na skúmanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz na všetkých 23 ľudských chromozómoch, vrátane oboch pohlavných chromozómov. Knižnice boli sekvenované na Nástroj NovaSeq 6000Dx pomocou pracovného postupu analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Prenos mužských vzoriek do ženských vzoriek bol pozorovaný za prítomnosti načítania cieľa chromozómu Y v ženských vzorkách.

Prenos v rámci cyklu je možné pozorovať počas generovania klastrov, volania bázy indexového cyklu a demultiplexácie vzorky. Na testovanie prenosu vzorky v rámci chodu sekvenovania sa na prístroji Nástroj NovaSeq 6000Dx sekvenovala skupina knižnice pozostávajúca z najmenej dvanástich replikátov každej jedinečnej mužskej a ženskej vzorky plus dvoch kontrol bez šablóny, celkovo 192 jedinečne indexovaných knižníc, v dvoch chodoch sekvenovania po jednom s reagensiami S2 a S4. Prenos vzorky v rámci cyklu bol hodnotený porovnaním cieľového pokrytia chromozómu Y každého ženského replikátu s priemerným cieľovým pokrytím chromozómu Y všetkých mužských replikátov v súbore. 95. percentil pozorovaných prenosov v rámci chodu bol 0,0090 % a 0,041 % pre reagenty S2 a S4.

Na testovanie prenosu vzoriek medzi jednotlivými chodmi boli pripravené dve skupiny knižnice a sekvenované postupne na jednom prístroji Nástroj NovaSeq 6000Dx, pričom strana A použila reagenty S4 a strana B použila reagenty S2. Prvá skupina obsahovala najmenej dvanásť opakovaní šiestich jedinečných ženských vzoriek plus dve kontroly bez šablón, celkovo 96 jedinečne indexovaných knižníc. Druhá skupina obsahovala najmenej dvanásť opakovaní šiestich jedinečných mužských vzoriek plus dve kontroly bez šablón, celkovo 96 jedinečne indexovaných knižníc. Obidva súbory využívali rovnakú množinu adaptérov indexu. Ženská skupina bola sekvenčne spracovaná ako prvá, po nej nasledovala mužská skupina a ďalší opakovaný sekvenčný cyklus ženskej skupiny. Prenos vzorky medzi jednotlivými chodmi bol hodnotený podľa typu reagentov, S2 a S4, porovnaním cieľového pokrytia Y chromozómom medzi zodpovedajúcimi replikátmi opakovaného chodu ženskej skupiny a mužskej skupiny. 95. percentil pozorovaného prenosu medzi jednotlivými chodmi bol 0,0089 % a 0,012 % pre reagenty S2 a S4.

## Vstup DNA

### Krv (Germline)

Vstupný rozsah DNA krvi pre Illumina DNA Prep with Enrichment Dx súpravu pomocou DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie bol stanovený pre NovaSeq 6000Dx. Tento rozsah bol hodnotený prostredníctvom štúdie sériového riešenia použitím ôsmich vzoriek DNA platinového genómu (NA12877 – NA12884) s reprezentatívnou analýzou slúžiacou na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 1 970 505 báz v rámci 23 ľudských chromozómov. Knižnice boli sekvenované na jednej Nástroj NovaSeq 6000Dx použitím jednej šarže každého z Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov).

Uskutočnil sa test siedmich vzoriek v duplikátoch v rámci šiestich vstupných úrovní DNA v rozsahu od 1 000 ng do 10 ng (1 000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng a 10 ng). Ôsma vzorka (NA12884) sa testovala ako jeden replikát pri 10 ng vstupe a duplicitne pre všetky ostatné vstupné úrovne. Na určenie správnosti boli genotypy vzoriek porovnané s platinovými genómami, verzia 2016-1.0. Výsledky boli stanovené pre každú vstupnú úroveň. PPA pre každý typ variantu (SNV, zavedenia a delécie) je uvedená v časti [Výsledky PPA pre každý vstup DNA krvi podľa typu variantu na strane 31](#). NPA je prezentovaná v [NPA pre každý vstup DNA krvi na strane 32](#). Všetky vstupné úrovne vykazovali podobnú presnosť. Odporúčaný vstup DNA krvi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je 50 – 1 000 ng, pričom 1 000 ng a 10 ng poskytuje horný a dolný limit na splnenie výkonnostných charakteristík pri sekvenovaní na NovaSeq 6000Dx.

Tabuľka 9 Výsledky PPA pre každý vstup DNA krvi podľa typu variantu

Vstup DNA (ng)	Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	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	
1 000		74112	73	7	99,9	
10	Zavedenie	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	
1 000		2921	5	2	99,8	
10	Delécia	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	
1 000		2195	2	43	99,9	

Tabuľka 10 NPA pre každý vstup DNA krvi

Vstup DNA (ng)	TN	FP	Nulové analýzy referencie	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
1 000	122978527	324	471882	>99,9

## FFPE (modul Somatic)

Vstupný rozsah DNA fixovanej vo formalíne zaliatej do parafínu (FFPE) pre súpravu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bol stanovený pre prístroj NovaSeq 6000Dx. Tento rozsah bol hodnotený prostredníctvom štúdie sériového riešenia použitím dvoch platinových genomických vzoriek s reprezentatívnou analýzou slúžiacou na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 1 970 505 báz v rámci 23 ľudských chromozómov. Knižnice boli sekvenované na jednej Nástroj NovaSeq 6000Dx použitím jednej šarže každého z Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov).

Vzorka GM12877 DNA bola zriadená vzorkou GM12878 DNA na vytvorenie GM12877-13 s jedinečnými heterozygotnými a homozygotnými variantmi GM12877 s frekvenciami blízkymi 6,5 % a 13 %. Testoval sa aj nezriadený GM12877. GM12877-13 bol testovaný duplicitne na štyroch úrovniach vstupu DNA v rozsahu od 1 000 ng do 25 ng (1 000 ng, 250 ng, 50 ng a 25 ng). GM12877 bol testovaný ako jeden replikát pri 250 ng a duplicitne pre všetky ostatné vstupné úrovne. Na stanovenie presnosti sa analýzy variantov vzoriek porovnali s platinovým genómom verzie 2016-1.0. Výsledky boli stanovené pre každú vstupnú úroveň. PPA pre každý variantný typ (SNV, zavedenia a delécie) je uvedený vo výsledkoch [Výsledky PPA pre každý vstup FFPE DNA podľa typu variantu a cieľového VAF na strane 32](#). NPA je prezentovaná v [NPA pre každý vstup FFPE DNA na strane 33](#). Všetky vstupné úrovne vykazovali podobnú presnosť. Pre vzorky FFPE s hodnotou  $\Delta Cq \leq 5$  je odporúčaný vstup DNA 50 – 1 000 ng pre Illumina DNA Prep with Enrichment Dx súpravu s 1 000 ng a 25 ng, ktorá poskytuje horný a dolný limit na splnenie funkčných charakteristík pri sekvenovaní na prístroji NovaSeq 6000Dx.

Tabuľka 11 Výsledky PPA pre každý vstup FFPE DNA podľa typu variantu a cieľového VAF

VAF cieľového riedenia											
		0,065					0,13				
Vstup DNA (ng)	Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	PPA (%)	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	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
1 000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100



VAF cieľového riedenia											
0,065						0,13					
Vstup DNA (ng)	Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	PPA (%)	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	PPA (%)
25	Zavedenie	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
1 000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Delécia	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
1 000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tabuľka 12 NPA pre každý vstup FFPE DNA

Vstup DNA (ng)	Očakávaný štandardný typ	TN	FP	Nulové analýzy referencie	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	>99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	>99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	>99,9
1 000	29030903	29030596	307	1822781	>99,9

## Analytická citlivosť (limit blanku [LoB] a detekčný limit [LoD])

Táto štúdia bola vykonaná s cieľom vyhodnotiť Limit of Blank (LoB) a Limit of Detection (LoD) pre pracovný postup analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie v Nástroj NovaSeq 6000Dx. Táto štúdia bola vykonaná pomocou reprezentatívnej analýzy určenej na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 1 970 505 báz vo 23 ľudských chromozómoch. Bunkové línie platinového genómu GM12878 a GM12877 boli po extrakcii DNA fixované vo formalíne a zaliate v parafíne. Roztoky GM12877 na GM12878 boli pripravené na výrobu vzoriek pozostávajúcich z 0 %, 4 %, 6,5 % a 13 % GM12877 podľa objemu tak, aby sa variantné frekvencie 489 jedinečných variantov GM12877 (454 SNV, 17 zavedení a 18 delécií) pohybovali v rozmedzí od 0 do 0,13. Knižnice vzoriek boli pripravené s použitím dvoch šarží reagensí Illumina DNA Prep with Enrichment Dx súpravy a sekvenované počas šiestich po sebe nasledujúcich počiatkových dní s dvoma Nástroj NovaSeq 6000Dx a dvoma šaržami každého z Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov), pre celkovo dvanásť chodov sekvenovania. Výsledkom bolo 288 pozorovaní každého variantu v každom roztoku vzorky. Limity LoB a LoD boli vypočítané použitím klasického prístupu uvádzaného v dokumente CLSI EP17-A2. Limity LoB a LoD boli vypočítané pre čidlá S2 a S4 samostatne združovaním variantných frekvencií všetkých variantov v rámci chodu sekvenovania pre každý typ reagensie. Chyba typu I bola definovaná na úrovni 0,01 a chyba typu II bola definovaná na úrovni 0,05.

Limit LoB bol hodnotený v rámci 489 miest nezávisle v dvoch šaržiach sekvenovania pre každý typ reagencie (S2 alebo S4) a prípravu knižnice. Pri reagenziách S2 bol 95. percentil LoB 2,9 % Pri reagenziách S4 bol 95. percentil LoB 2,2 %.

Limit LoD bol úspešne vypočítaný pre 478 zo 489 variantov S2 reagencie a 485 zo 489 variantov S4 reagencie. Varianty, v ktorých nebol stanovený limit LoD pre jednu alebo obe prípravy knižnice, boli vylúčené z konečného priradenia limitu LoD pre NovaSeq 6000Dx systém. Limit LoD NovaSeq 6000Dx systému s reagenziami S2 a S4 bol stanovený pomocou 95. percentilu limitu LoD jednotlivých variantov. Pri reagenziách S2 bol 95. percentil naprieč 478 variantmi LoD 4,8 %. Pri reagenziách S4 bol 95. percentil naprieč 485 variantmi LOD 3,9 %.

# Správnosť

## Germline

Uvedená štúdia bola vykonaná na posúdenie presnosti analýzy variantov pracovného postupu analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie na Nástroj NovaSeq 6000Dx pomocou Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov). Štyri jedinečné vzorky DNA platinového genómu boli testované pomocou reprezentatívneho testu navrhnutého na skúmanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz (9 232 cieľov) na všetkých 23 ľudských chromozómoch. Každá zo vzoriek bola testovaná v replikátoch po 12 s výnimkou NA12880, ktoré boli testované v replikátoch po 11. Vykonalo sa celkom 18 chodov použitím troch sekvenčných prístrojov, troch šarží S2 reagensí a dvoch operátorov v priebehu šiestich dní. Presnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie porovnaním výsledkov s platinovými genómami verzie 2016-1.0.

Tabuľka 13 Súhrnné informácie o zhode – modul Germline

Kritériá	Pozorovania celkom <sup>1</sup>	Výsledok pozorovania <sup>2</sup>	Výsledok podľa cyklu <sup>3</sup>
PPA pre SNV	846	99,8	99,9
PPA pre zavedenia	846	97,9	>99,9
PPA pre delécie	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

<sup>1</sup>Vypočítané ako počet vzoriek na cyklus (47) × počet chodov (18) = 846.

<sup>2</sup>Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci všetkých 18 chodov.

<sup>3</sup>Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého cyklu.

*Zhoda podľa vzoriek – modul Germline na strane 36* obsahuje údaje štúdie prezentované s pozitívnou a negatívnou percentuálnou zhodou podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s platinovými genómami, verzia 2016-1.0, na účely výpočtov PPA. Tri typy variantov (SNV, zavedenia a delécie) sú skombinované. Keďže referenčná metóda poskytuje iba výsledky za varianty s jedným nukleotidom a zavedenia/delécie, výsledky nevariantnej bázy sa porovnávajú so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19 na účely výpočtov NPA.

Tabuľka 14 Zhoda podľa vzoriek – modul Germline

Vzorka	Automatické predkladanie	Očakávané varianty <sup>1</sup>	TP	FN	Nulové analýzy variantu	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

<sup>1</sup> Celkový počet variantov vo všetkých replikátoch vzoriek v rámci 18 chodov.

*Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Germline na strane 36* obsahuje údaje štúdie prezentované podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou. Detekcia sa hodnotí pre každý typ variantu – SNV, zavedenia a delécie – osobitne. Referenčné polohy sú vylúčené.

Tabuľka 15 Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Germline

Vzorka	SVN			Zavedenia			Delécie		
	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN	Očakávané	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

Vzorky boli následne analyzované z hľadiska volania malých zavedení a delécií (indelov). Celkový súhrn je uvedený v *Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Germline na strane 36*. Celkom existovalo 210 indelov s veľkosťou 1 – 18 bp (zavedenia) a 1 – 21 bp (delécie).

Tabuľka 16 Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Germline

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	PPA
Zavedenie	36954	36953	1	0	>99,9
Delécia	29358	28986	16	356	99,9

Reprezentatívny test pozostával z 9 232 cieľov, ktoré pokrývali rôzny genómový obsah. Obsah GC cieľov spadal do rozsahu 0,20 – 0,86. Ciele taktiež obsahovali určité rozsahy opakovaní jedného nukleotidu (napríklad PolyA, PolyT), dinukleotidu a trinukleotidu. Údaje

zostavené na základe jednotlivých chromozómov na určenie vplyvu genómového obsahu na percento správnych volaní sú uvedené v časti [Presnosť na úrovni chromozómov Germline na strane 37](#). Percentuálne správne analýzy sa skladajú z variantných a referenčných analýz a dosahujú hodnotu 100 %, ak existujú nesprávne alebo nulové analýzy.

Tabuľka 17 Presnosť na úrovni chromozómov Germline

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Zavedenie (18), Delécia (4)	[0,22 – 0,8]; Medián: 0.51	114888718	34	966860	>99,9	0.83
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Zavedenie (5), Delécia (2)	[0,24 – 0,81]; Medián: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Zavedenie (11), Delécia (1)	[0,25 – 0,86]; Medián: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Zavedenie (2), Delécia (2)	[0,27 – 0,77]; Medián: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Zavedenie (8), Delécia (18)	[0,29 – 0,79]; Medián: 0,46	75314497	912	153061	>99,9	0,20
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Zavedenie (4), Delécia (2)	[0,24 – 0,79]; Medián: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Zavedenie (1), Delécia (4)	[0,2 – 0,77]; Medián: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Zavedenie (4), Delécia (1)	[0,26 – 0,78]; Medián: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30



Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Zavedenie (4), Delécia (1)	[0,27 – 0,83]; Medián: 0,49	72650800	20	241991	>99,9	0,33
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Zavedenie (1), Delécia (1)	[0,23 – 0,78]; Medián: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Zavedenie (2), Delécia (2)	[0,28 – 0,8]; Medián: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Zavedenie (1), Delécia (5)	[0,26 – 0,77]; Medián: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Zavedenie (14), Delécia (0)	[0,28 – 0,79]; Medián: 0,42	48503179	1	45666	>99,9	0,09
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Zavedenie (4), Delécia (1)	[0,29 – 0,77]; Medián: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Zavedenie (4), Delécia (6)	[0,29 – 0,76]; Medián: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Zavedenie (15), Delécia (21)	[0,3 – 0,76]; Medián: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Zavedenie (18), Delécia (16)	[0,28 – 0,82]; Medián: 0,49	97929929	417	335905	>99,9	0,34
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Zavedenie (4), Delécia (0)	[0,22 – 0,78]; Medián: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Zavedenie (2), Delécia (21)	[0,33 – 0,83]; Medián: 0,59	85642066	3	678213	>99,9	0,79
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Zavedenie (5), Delécia (0)	[0,31 – 0,84]; Medián: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Zavedenie (2), Delécia (5)	[0,22 – 0,78]; Medián: 0,52	25319736	50	57434	>99,9	0,23
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Zavedenie (6), Delécia (0)	[0,27 – 0,74]; Medián: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Zavedenie (3), Delécia (0)	[0,2 – 0,72]; Medián: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Zavedenie (0), Delécia (0)	[0,4 – 0,59]; Medián: 0,45	0	0	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa

Výsledky sekvenčného spracovania pre vzorku NA12878 boli porovnané s vysoko dôveryhodným genotypom z hľadiska NA12878, vytvoreným Národnými inštitútmi noriem a technológie (NIST) (v.2.19). Spomedzi 9 232 cieľov bolo 8 009 cieľov úplne obsiahnutých vo vysoko dôveryhodných genomových oblastiach, 776 cieľov vykazovalo čiastočný presah a 447 cieľov nemalo žiadny presah v sekvencii NIST. Tento výsledok viedol k porovnaniu 1 831 483 súradníc/replikát. Nevariantné primárne analýzy báz boli porovnané so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19. Výsledky presnosti sú uvedené v dokumente [Modul Germline – zhoda vzorky NA12878 s databázou NIST na strane 48](#).

Tabuľka 18 Modul Germline – zhoda vzorky NA12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet zahrnutých cieľov	Automatické predkladanie	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9



Na základe údajov poskytnutých touto 18-chodovou štúdiou Germline dokáže prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx konzistentne sekvenovať:

- Obsah GC  $\geq$  20 % (všetky analyzované bázy v 1692 sekvenovaných cieľových oblastiach so správne analyzovaným 20 % obsahom GC a mierou nulových analýz 0 %)
- Obsah GC  $\leq$  86 % (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach so správne analyzovaným 86 % obsahom GC a mierou nulových analýz 0 %)
- Dĺžky PolyA  $\leq$  46 (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach so 46 opakovaniami PolyA správnych analýz a mierou nulových analýz 0,27 %)
- Dĺžky PolyT  $\leq$  40 (13384074 z 13384321 analyzovaných báz v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach so 40 opakovaniami PolyT správnych analýz a mierou nulových analýz 0,26 %)
- Dĺžky PolyG  $\leq$  11 (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 11 opakovaniami PolyG správnych analýz a mierou nulových analýz 0 %)
- Dĺžky PolyC  $\leq$  8 (9815030 z 9815035 analyzovaných báz v 5922 sekvenovaných cieľových oblastiach s 8 opakovaniami PolyC správnych analýz a mierou nulových analýz 0,53 %)
- Dĺžky opakovaní dinukleotidov  $\leq$  31x (32233922 z 32233926 analyzovaných báz v 846 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach s 31 opakovaniami dinukleotidov boli analyzované správne s mierou nulových analýz 0,21 %)
- Dĺžky opakovaní trinukleotidov  $\leq$  23x (všetky analyzované bázy v 846 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach s 23 opakovaniami trinukleotidov boli analyzované správne s mierou nulových analýz 0,21 %)
- Dĺžky zavedenia  $\leq$  18 (všetky analyzované bázy v 1692 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach s 18 správne analyzovanými zavedeniami a mierou nulových analýz 7,71 %)
- Dĺžky delécie  $\leq$  21 (všetky analyzované bázy v 1692 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach s 21 správne analyzovanými deléciami a mierou nulových analýz 1,14 %)

## Somatic

Tu opísaná štúdia bola použitá na vyhodnotenie presnosti analyzovaného variantu pracovného postupu analýzy generovania Somatic FASTQ a VCF DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie na Nástroj NovaSeq 6000Dx pomocou Súprava reancií NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov).

V tejto štúdií bola použitá reprezentatívna analýza určená na dotazovanie rôznych génov zahŕňajúcich 1 970 505 báz (9 232 cieľov) vo 23 ľudských chromozómoch. Platinová genomická DNA bola extrahovaná z ošetrovaných blokov FFPE na účely generovania štyroch jedinečných vzoriek na hodnotenie v rámci štúdie.

Vzorka GM12877 DNA bola zriedená vzorkou GM12878 DNA na vytvorenie GM12877-13 s jedinečnými heterozygotnými a homozygotnými variantmi GM12877 s frekvenciami blízky 6,5 % a 13 %. Vzorka GM12878 DNA bola podobne zriedená vzorkou GM12877 DNA na vytvorenie GM12878-13 s jedinečnými heterozygotnými a homozygotnými variantmi GM12878 pri frekvenciách blízky 6,5 % a 13 %. Testovali sa aj nezriedené vzorky GM12877 a GM12878. Každá zo vzoriek bola testovaná v replikátoch po 12 s výnimkou neriedeného GM12878, ktoré boli testované v replikátoch po jedenástich. Celkovo sa vykonalo osemnásť cyklov s použitím troch sekvenčných prístrojov, troch šarží reagentov S4 a dvoch operátorov počas šiestich počiatočných dní. Presnosť bola stanovená pre SNV, zavedenia a delécie porovnaním výsledkov s platinovými genómami verzie 2016-1.0.

Tabuľka 19 Súhrnné informácie o zhode – modul Somatic

Kritériá	Počet pozorovaní <sup>1</sup>	Výsledok pozorovaní <sup>2</sup>	Výsledok podľa chodu <sup>3</sup>
PPA pre somatické SNV	846	99,8	98,9
PPA na somatické zavedenia	846	100	100
PPA na somatické delécie	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

<sup>1</sup> Vypočítané ako = počet vzoriek na chod (47) x počet chodov (18) = 846.

<sup>2</sup> Najnižšia pozorovaná hodnota podľa replikátov vzorky v rámci všetkých 18 chodov.

<sup>3</sup> Najnižšia hodnota počas agregovanej analýzy údajov z každého chodu.

*Zhoda podľa vzoriek – modul Somatic na strane 50* obsahuje údaje štúdie prezentované s pozitívnou a negatívnou percentuálnou zhodou podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou na účely výpočtov PPA. Tri typy variantov (SNV, zavedenia a delécie) sú skombinované. Keďže referenčná metóda poskytuje iba výsledky za varianty s jedným nukleotidom a zavedenia/delécie, výsledky nevariantnej bázy sa porovnávajú so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19 na účely výpočtov NPA.

Tabuľka 20 Zhoda podľa vzoriek – modul Somatic

Vzorka	Automatické predkladanie	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9

Vzorka	Automatické predkladanie	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	94,5	96768	96278	0	490	395002023	1278	100	>99,9	>99,9
GM12877-13	94,7	104976	103029	216	1731	395989324	1286	99,8	>99,9	>99,9
GM12878-13	95,2	96768	96027	0	741	397900884	1218	100	>99,9	>99,9

*Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Somatic na strane 51* obsahuje údaje štúdie prezentované podľa vzoriek, kedy sa výsledky variantov porovnávajú s dobre charakterizovanou zloženou referenčnou metódou. Detekcia sa hodnotí pre každý typ variantu – SNV, zavedenia a delécie – osobitne. Referenčné polohy sú vylúčené.

Tabuľka 21 Zhoda podľa vzoriek a typu variantu – modul Somatic

Vzorka	SNV			Zavedenia			Delécie		
	Očakávané	TP	FN	Očakávané	TP	FN	Očakávané	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

Štyri vzorky boli následne analyzované z hľadiska volania malých zavedení a delécií (indelov). Celkový súhrn je uvedený v [Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Somatic na strane 51](#). Celkom existovalo 210 indelov s veľkosťou 1 – 18 bp (zavedenia) a 1 – 21 bp (delécie).

Tabuľka 22 Súhrnné informácie o detekcii indelov modulom Somatic

Typ variantu	Očakávané varianty	TP	FN	Nulové analýzy variantu	PPA
Zavedenie	11772	11772	0	0	100
Delécia	10098	9666	0	432	100

Reprezentatívny test pozostával z 9 232 cieľov, ktoré pokrývali rôzny genómový obsah. Obsah GC cieľov spadal do rozsahu 0,20 – 0,86. Ciele taktiež obsahovali určité rozsahy opakovaní jedného nukleotidu (napríklad PolyA, PolyT), dinukleotidu a trinukleotidu. Údaje

zostavené na základe jednotlivých chromozómov na určenie vplyvu genómového obsahu na percento správnych hovorov sú uvedené v časti [Presnosť na úrovni somatických chromozómov na strane 52](#). Percentuálne správne analýzy sa skladajú z variantných a referenčných analýz a dosahujú hodnotu 100 %, ak existujú nesprávne alebo nulové analýzy.

Tabuľka 23 Presnosť na úrovni somatických chromozómov

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Zavedenie (3), Delécia (0)	[0,22 – 0,8]; Medián: 0.51	110145939	52	5642613	>99,9	4,9
chr2	39	628	159588	Poly A (46), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (7), Dinukleotid (22), Trinukleotid (8), Zavedenie (5), Delécia (1)	[0,24 – 0,81]; Medián: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4,4

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinukleotid (12), Trinukleotid (6), Zavedenie (1), Delécia (1)	[0,25 – 0,86]; Medián: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4,3
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinukleotid (5), Trinukleotid (5), Zavedenie (0), Delécia (1)	[0,27 – 0,77]; Medián: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4,1

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (10), Trinukleotid (8), Zavedenie (8), Delécia (18)	[0,29 – 0,79]; Medián: 0,46	72261191	723	3116981	>99,9	4,1
chr6	39	453	126721	Poly A (28), Poly C (7), Poly T (33), Poly G (7), Dinukleotid (18), Trinukleotid (11), Zavedenie (0), Delécia (1)	[0,24 – 0,79]; Medián: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4,7

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (31), Trinukleotid (5), Zavedenie (1), Delécia (4)	[0,2 – 0,77]; Medián: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4,4
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (9), Zavedenie (4), Delécia (0)	[0,26 – 0,78]; Medián: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5,2

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinukleotid (9), Trinukleotid (9), Zavedenie (0), Delécia (1)	[0,27 – 0,83]; Medián: 0,49	69594586	74	3260257	>99,9	4,5
chr10	14	317	66723	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Dinukleotid (16), Trinukleotid (6), Zavedenie (0), Delécia (0)	[0,23 – 0,78]; Medián: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4,4



Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinukleotid (26), Trinukleotid (7), Zavedenie (2), Delécia (2)	[0,28 – 0,8]; Medián: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4,8
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinukleotid (7), Trinukleotid (7), Zavedenie (0), Delécia (3)	[0,26 – 0,77]; Medián: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4,3

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinukleotid (6), Trinukleotid (8), Zavedenie (14), Delécia (0)	[0,28 – 0,79]; Medián: 0,42	46130028	44	2384839	>99,9	4,9
chr14	11	147	26980	Poly A (21), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (11), Dinukleotid (6), Trinukleotid (6), Zavedenie (4), Delécia (0)	[0,29 – 0,77]; Medián: 0,47	21336891	0	1078329	100	4,8

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinukleotid (8), Zavedenie (4), Delécia (0)	[0,29 – 0,76]; Medián: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4,0
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (10), Zavedenie (15), Delécia (21)	[0,3 – 0,76]; Medián: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6,8

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinukleotid (13), Trinukleotid (6), Zavedenie (18), Delécia (1)	[0,28 – 0,82]; Medián: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (6), Trinukleotid (10), Zavedenie (0), Delécia (0)	[0,22 – 0,78]; Medián: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6,2

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (7), Zavedenie (2), Delécia (3)	[0,33 – 0,83]; Medián: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5,6
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinukleotid (9), Zavedenie (5), Delécia (0)	[0,31 – 0,84]; Medián: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinukleotid (5), Zavedenie (1), Delécia (0)	[0,22 – 0,78]; Medián: 0,52	24169250	44	1172087	>99,9	4,6
chr22	10	187	36727	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (19), Poly G (7), Dinukleotid (5), Trinukleotid (6), Zavedenie (6), Delécia (0)	[0,27 – 0,74]; Medián: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6

Chromozóm	Počet génov	Počet cieľov	Počet báz	Genomový obsah	Rozsah GC	Správne analýzy	Nesprávne analýzy	Nulové analýzy	% správnych analýz	% nulových analýz
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinukleotid (5), Trinukleotid (23), Zavedenie (3), Delécia (0)	[0,2 – 0,72]; Medián: 0,48	64231080	241	3852253	>99,9	5,7
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), Zavedenie (0), Delécia (0)	[0,4 – 0,59]; Medián: 0,45	0	0	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa

Výsledky sekvenčného spracovania pre vzorku GM12878 boli porovnané s vysoko dôveryhodným genotypom z hľadiska NA12878, vytvoreným Národným inštitútom noriem a technológie (NIST) (v.2.19). Spomedzi 9 232 cieľov bolo 8 009 cieľov úplne obsiahnutých vo vysoko dôveryhodných genomových oblastiach, 776 cieľov vykazovalo čiastočný presah a 447 cieľov nemalo žiadny presah v sekvencii NIST. Tento výsledok viedol k porovnaniu 1 831 483 súradníc/replikát. Nevariantné primárne analýzy báz boli porovnané so štruktúrou referenčnej sekvencie ľudského genómu hg19. Výsledky presnosti sú uvedené v časti [Modul Somatic – zhoda vzorky GM12878 s databázou NIST na strane 63](#).

Tabuľka 24 Modul Somatic – zhoda vzorky GM12878 s databázou NIST

Vzorka	Počet zahrnutých cieľov	Automatické predkladanie	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Na základe údajov poskytnutých touto 18-chodovou štúdiou Somatic dokáže prístroj Nástroj NovaSeq 6000Dx konzistentne sekvenčne spracovať:

- Obsah GC  $\geq$  20 % (všetky analyzované bázy v 1692 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach so správne analyzovaným 20 % obsahom GC a mierou nulových analýz 0,34 %)
- Obsah GC  $\geq$  86 % (všetky analyzované bázy v 846 sekvenčne spracovaných cieľových oblastiach so správne analyzovaným 86 % obsahom GC a mierou nulových analýz 4,21 %)
- Dĺžky PolyA  $\leq$  46 (14550082 z 14550083 analyzovaných báz v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach so 46 správne analyzovanými opakovaniami PolyA a mierou nulových analýz 4,18 %)
- Dĺžky polyT  $\leq$  40 (12833489 z 12833491 analyzovaných báz v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach so 40 správne analyzovanými opakovaniami PolyA a mierou nulových analýz 4,37 %)
- Dĺžky PolyG  $\leq$  11 (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 11 správne analyzovanými opakovaniami PolyG a mierou nulových analýz 7,59 %)
- Dĺžky PolyC  $\leq$  8 (9405604 z 9405615 analyzovaných báz v 5922 sekvenovaných cieľových oblastiach s 8 správne analyzovanými opakovaniami PolyC a mierou nulových analýz 4,68 %)
- Dĺžky opakovaní dinukleotidov  $\leq$  31x (30996684 z 30996712 analyzovaných báz v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 31 správne analyzovanými opakovaniami dinukleotidov a mierou nulových analýz 4,04 %)
- Dĺžky opakovaní trinukleotidov  $\leq$  23x (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 23 správne analyzovanými opakovaniami trinukleotidov a mierou nulových analýz 5,39 %)
- Dĺžky zavedenia  $\leq$  18 (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 18 správne analyzovanými zavedeniami a mierou nulových analýz 1,44 %)
- Dĺžky delécie  $\leq$  21 (všetky analyzované bázy v 846 sekvenovaných cieľových oblastiach s 21 správne analyzovanými deléciami a mierou nulových analýz 7,86 %)



## Presnosť

Presnosť prístroja Nástroj NovaSeq 6000Dx bola hodnotená použitím platinových genómových vzoriek s reprezentatívnou analýzou určenou na dotazovanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz v rámci 23 rôznych chromozómov pomocou 9 232 oligonukleotidov. Celkovo bolo hodnotených 1 723 cieľných malých variantov (SNV, zavedenia a delécie). Testovanie Germline sa skladalo z jedenástich alebo dvanástich opakovaní štyroch jedinečných vzoriek platinového genómu. Testovanie Somatic pozostávalo z jedenástich alebo dvanástich replikátov štyroch jedinečných vzoriek platinového genómu ošetrovaných FFPE na rôznych úrovniach VAF. Knižnice vzoriek boli pripravené pomocou súprav reagencií Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Testovanie sa vykonalo na jednom internom pracovisku s použitím troch Nástroj NovaSeq 6000Dx, troch šarží každého z Súprava reagencií NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagencií NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov) a dvoch operátorov počas šiestich počiatočných dní. Každý počiatočný deň boli knižnice vzoriek Germline sekvenované na jednej strane prístroja pomocou reagencií S2 a pracovného postupu analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a knižnice vzoriek Somatic boli sekvenované na druhej strane prístroja pomocou reagencií S4 a pracovného postupu analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Toto testovanie zahŕňalo 18 prietokových článkov pre pracovné postupy Germline a Somatic.

## Germline

V prípade chodov Germline sú genómové miesta, kde sa deteguje cieľný variant Germline, hlásené ako pozitívne (variant). V prípade očakávaných pozitívnych variantov Germline sa údaje hodnotili z hľadiska nulovej miery analýz a percenta pozitívnych analýz (PPC) v rámci každého typu variantu (SNV, zavedenie, delécia). [Presné laboratórne pozorovania analýz Germline – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu na strane 65](#) sú zhrnuté pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 25 Presné laboratórne pozorovania analýz Germline – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované pozitívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
SNV	6	980316	< 0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
Zavedenie	0	36738	0	36738	36738	100	> 99,99	100
Delécia	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cieľná chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Pozitívna analýza je definovaná ako cieľné chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Genómové miesta, kde nie je detekovaný zacielený variant, sú hlásené ako negatívne (štandardný typ). V prípade očakávaných negatívnych miest sa údaje vyhodnotili z hľadiska miery nulových analýz a percenta negatívnych analýz (PNC). [Presné laboratórne pozorovania analýz Germline – očakávané negatívne výsledky na strane 66](#) sú zhrnuté pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 26 Presné laboratórne pozorovania analýz Germline – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované negatívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
Štandardný typ	0	406170	0	406170	406170	100	> 99,99	100

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cielená chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Negatívna analýza je definovaná ako cielené chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Príspevok každého parametra (prístroj, šarža reagensí, deň, replikát knižnice) k celkovej variabilite sa určil analýzou komponentov rozptylu s použitím variantnej frekvencie ako premennej odozvy. Celková štandardná odchýlka mala priemer 0,0370. Najväčším prispievateľom k variantnej frekvenčnej variabilite boli replikáty prípravy knižnice, ktoré prispeli k 17,1 % celkovej variability. Deň prispel k 1 %, zatiaľ čo prístroj a šarža reagensí prispeli k menej ako 1 % celkovej variability [Presné laboratórne odhady variantných komponentov – frekvencie vzorových variantov Germline na strane 66](#) (SD = štandardná odchýlka).

Tabuľka 27 Presné laboratórne odhady variantných komponentov – frekvencie vzorových variantov Germline

Komponent	Priemerná štandardná odchýlka (SD)	Priemerné % celkovej SD
Deň	0,0020	1,028
Prístroj	0,0018	0,837
Spotrebná šarža	0,0016	0,712
Replikát knižnice	0,0143	17,110
Celkom	0,0370	100

## Somatic

Pri chodoch Somatic sa genómové miesta, kde sa deteguje cielený variant Somatic, uvádzajú ako pozitívne (variant). Pri zriedených vzorkách GM12877-13 a GM12878-13 s očakávanými pozitívnymi variantmi Somatic pri hodnote VAF od 6,5 % do 13 % boli údaje vyhodnotené z hľadiska miery nulovej analýzy a percenta pozitívnych analýz (PPC) v rámci každého typu variantu (SNV, zavedenie, delécia). [Presné laboratórne pozorovania analýz Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu \(Priemerná hodnota VAF je  \$\geq 6,5\%\$  a  \$\leq 13\%\$ \) na strane 67](#) sú zhrnuté pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 28 Presné laboratórne pozorovania analýz Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (Priemerná hodnota VAF je  $\geq 6,5\%$  a  $\leq 13\%$ )

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované pozitívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
Zavedenie	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Delécia	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cielená chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Pozitívna analýza je definovaná ako cielené chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Genómové miesta, kde nie je detekovaný zacielený variant Somatic, sú hlásené ako negatívne (štandardný typ). V prípade očakávaných pozícií negatívnych variantov Somatic boli údaje hodnotené z hľadiska miery výskytu nulových analýz a miery výskytu negatívnych analýz. [Presné laboratórne pozorovania analýz Somatic – očakávané negatívne výsledky na strane 67](#) sú zhrnuté pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou metódy Wilsonovho skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 29 Presné laboratórne pozorovania analýz Somatic – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované negatívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
Štandardný typ	0	194922	0	194919	194922	> 99,99	> 99,99	100

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cielená chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Negatívna analýza je definovaná ako cielené chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Príspevok každého parametra (prístroj, šarža reagentov, deň, replikát knižnice) k celkovej variabilite sa určil analýzou komponentov rozptylu s použitím variantnej frekvencie ako premennej odozvy. Celková štandardná odchýlka mala priemer 0,0062. Najvýznamnejším zdrojom variability zostali replikáty prípravy knižnice, ktoré predstavovali 50,7 % z celkového počtu. Deň, prístroj a šarža spotrebného materiálu prispeli k menej ako 1 % celkovej variability [Presné laboratórne odhady variantných komponentov – frekvencie vzorových variantov Somatic na strane 67](#) (SD = štandardná odchýlka).

Tabuľka 30 Presné laboratórne odhady variantných komponentov – frekvencie vzorových variantov Somatic

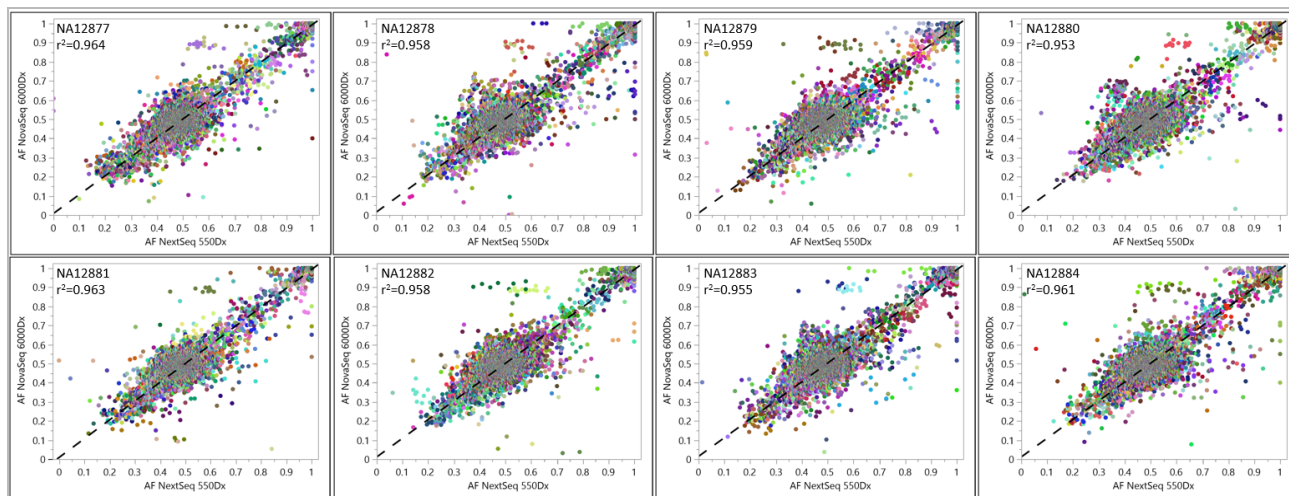
Komponent	Priemerná štandardná odchýlka (SD)	Priemerné % celkovej SD
Deň	0,0002	0,41
Prístroj	0,0002	0,40
Spotrebná šarža	0,0002	0,35

Komponent	Priemerná štandardná odchýlka (SD)	Priemerné % celkovej SD
Replikát knižnice	0,0044	50,7
Celkom	0,0062	100

## Metóda porovnania

Vykonala sa štúdia na porovnanie výkonnosti medzi prístrojmi NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx. Variantná frekvenčná zhoda pre vzorky krvi sa hodnotila pomocou reprezentatívnej analýzy určenej na dopytovanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz na všetkých 23 ľudských chromozómoch. Testovalo sa osem vzoriek DNA platinového genómu, sedem v replikátoch po šiestich a jedna (NA12881) v replikátoch po piatich. Knižnice boli sekvenované na prístroj NovaSeq 6000Dx pomocou pracovného postupu analýzy súborov Germline FASTQ a VCF generácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aplikácie a na prístroji NextSeq 550Dx pomocou modulu DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager. *Grafy korelácie frekvencie variantov (Body sú zafarbené podľa jedinečného variantu. Varianty môžu byť v každom jednotlivom grafe zafarbené inak.) na strane 68* vykresľuje koreláciu VAF medzi dvoma prístrojmi pre každú vzorku. Na základe významnej korelácie medzi prístrojmi NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx bolo určené, že charakteristiky účinnosti súvisiace s predanalytickými faktormi (napríklad metódy extrakcie alebo rušivé látky) sa vzťahujú na obidva prístroje. Ďalšie podrobnosti nájdete v príbalovom letáku prístroja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Obrázok 15 Grafy korelácie frekvencie variantov (Body sú zafarbené podľa jedinečného variantu. Varianty môžu byť v každom jednotlivom grafe zafarbené inak.)



## Reprodukovateľnosť

Reprodukovateľnosť prístroja NovaSeq 6000Dx bola hodnotená použitím vzoriek platinových genómov s reprezentatívnou analýzou určenou na dotazovanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz v rámci 23 rôznych chromozómov pomocou 9 232 oligonukleotidov. Celkovo bolo hodnotených 1 723 cielených malých variantov (SNV, zavedenia a delécie). Testovanie Germline sa skladalo z troch alebo štyroch opakovaní

dvanástich jedinečných platinových vzoriek. Testovanie Somatic sa skladalo z piatich alebo šiestich opakovaní ôsmich jedinečných vzoriek platinových genómov ošetrených FFPE na rôznych úrovniach VAF. Knižnice vzoriek boli pripravené pomocou súprav reagencií Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Testovanie sa vykonalo na troch externých pracoviskách s použitím jednej šarže každého z Súprava reagencií NovaSeq 6000Dx S2 v1.5 (300 cyklov) a Súprava reagencií NovaSeq 6000Dx S4 v1.5 (300 cyklov). Na každom pracovisku sa použil jeden Nástroj NovaSeq 6000Dx. Na každom pracovisku testovanie vykonali dvaja operátori. Každý operátor vykonal testovanie v troch po sebe nasledujúcich dňoch začiatku pre každý typ vzorky pre celkovo 36 prietokových článkov na troch pracoviskách. Každý počiatkový deň boli knižnice vzoriek Germline sekvenované na strane A prístroja pomocou reagencií S2 a pracovného postupu analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a knižnice vzoriek Somatic boli sekvenované na strane B prístroja pomocou reagencií S4 a pracovného postupu analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Toto testovanie zahŕňalo 18 prietokových článkov pre pracovné postupy Germline a Somatic.

## Germline

V prípade chodov Germline sú genómové miesta, kde sa deteguje cielený variant Germline, hlásené ako pozitívne (variant). V prípade očakávaných pozitívnych variantov Germline sa údaje hodnotili z hľadiska nulovej miery analýz a percenta pozitívnych analýz (PPC) v rámci každého typu variantu (SNV, zavedenie, delécia).

*Pozorovania analýz Germline – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu na strane 69* sumarizujú pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou Wilsonovej metódy skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 31 Pozorovania analýz Germline – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované pozitívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
Zavedenie	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Delécia	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cielená chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Pozitívna analýza je definovaná ako cielené chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Genómové miesta, kde nie je detekovaný zacielený variant, sú hlásené ako negatívne (štandardný typ). V prípade očakávaných negatívnych miest sa údaje vyhodnotili z hľadiska miery nulových analýz a percenta negatívnych analýz (PNC). *Pozorovania analýz Germline – očakávané negatívne výsledky na strane 70* sumarizujú pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 32 Pozorovania analýz Germline – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované negatívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
Štandardný typ	0	393516	0	393516	393516	100	> 99,99	100

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cieleňá chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Negatívna analýza je definovaná ako cieleňé chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

## Somatic

Pri chodoch Somatic sa genómové miesta, kde sa deteguje cieleňý variant Somatic, uvádzajú ako pozitívne (variant). V prípade očakávaných pozitívnych Somatic variantov, kde je priemerná frekvencia alel variantov (VAF) väčšia alebo rovná 14 % a menšia alebo rovná 28 %, sa údaje vyhodnotili mierou nulovej analýzy a percento pozitívnych hovorov (PPC) v rámci každého typu variantu. (SNV, zavedenie, delécia). [Pozorovania analýz Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu \(priemerné VAF  \$\geq\$  14 % a  \$\leq\$  28 %\) na strane 70](#) sumarizujú pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou Wilsonovej metódy skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 33 Pozorovania analýz Somatic – očakávané pozitívne výsledky podľa typu variantu (priemerné VAF  $\geq$  14 % a  $\leq$  28 %)

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované pozitívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PPC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98,99	98,92	99,07
Zavedenie	0	1962	0	1962	1962	100	99,80	100
Delécia	0	2142	0	2098	2142	97,95	97,25	98,47

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cieleňá chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Pozitívna analýza je definovaná ako cieleňé chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Genómové miesta, kde nie je detekovaný zacielený variant Somatic, sú hlásené ako negatívne (štandardný typ). V prípade očakávaných pozícií negatívnych variantov Somatic boli údaje hodnotené z hľadiska miery výskytu nulových analýz a miery výskytu negatívnych analýz. [Pozorovania analýz Somatic – očakávané negatívne výsledky na strane 71](#) sumarizujú pozorované hodnoty spolu s dolnou a hornou 95 % úrovňou spoľahlivosti (LCL/UCL) vypočítanou pomocou Wilsonovej metódy skóre pre každý typ variantu.

Tabuľka 34 Pozorovania analýz Somatic – očakávané negatívne výsledky

Typ variantu	Nulové pozorované analýzy <sup>1</sup>	Celkový počet analýz	Percentuálny podiel nulových analýz	Pozorované negatívne analýzy <sup>2</sup>	Celkový počet vyhodnotiteľných analýz	PNC	95 % LCL <sup>3</sup>	95 % UCL
Štandardný typ	0	92718	0	92714	92718	> 99,99	99,99	100

<sup>1</sup> Nulová analýza je definovaná ako cieleňá chromozomálna pozícia, kde nie je možné určiť variant (kvôli nízkej hĺbke pokrytia).

<sup>2</sup> Negatívna analýza je definovaná ako cieleňé chromozomálne pozície, pri ktorých dôjde k detekcii variantu.

<sup>3</sup> Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

## História revízií

Dokument	Dátum	Popis zmeny
Dokument č. 200025276 v01	September 2022	Aktualizované údaje o presnosti pre pozorovania analýz Germline.
Dokument č. 200025276 v00	August 2022	Úvodné vydanie.

## Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním produktu (produktov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

**NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).**

**SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU POPÍSANÉHO VÝROBKU (VÝROBKOV) (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).**

© 2022 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktné informácie



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Austrálsky zadávateľ

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

## Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na karte *Documentation* (Dokumentácia).