

Kullanım Talimatı

İN VİTRO TANI AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR
SADECE İHRACAT İÇİN

Kullanım Amacı

NovaSeq 6000Dx Aleti, *in vitro* tanı (IVD) testleri ile birlikte kullanıldığında DNA kitaplıklarını sekanslamak üzere tasarlanmıştır. NovaSeq 6000Dx Aleti, tescilli, sertifikalı veya onaylı IVD reaktifler ve analitik yazılı ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Prosedür İlkeleri

illumina® NovaSeq 6000Dx Aleti, *in vitro* diyagnostik testlerle DNA kitaplıklarını sekanslamak için tasarlanmıştır. NovaSeq 6000Dx girdi için, numune dizinlerinin ve yakalama sekanslarının amplifiye hedeflere eklendiği, DNA'dan oluşturulan kitaplıkları kullanır. Numune kitaplıkları bir akış hücresinde yakalanır ve sentezle sekanslama (SBS) kimyasıyla cihaz üzerinde sekanslanır. SBS kimyası, büyüyen DNA zincirlerine kaynaştıkça floresan etiketlemeli tek nükleotid bazlarını saptamak için dönüştürülebilir terminatör yöntemini kullanır. Real-Time Analysis (RTA) yazılımı görüntü analizi ve baz aramayı gerçekleştirir ve her bir sekanslama döngüsü için her baza bir kalite skoru atar. Birincil analiz sona erdiğinde, baz aramaları işlemek üzere dahil edilen ve gereken NovaSeq 6000Dx için illumina DRAGEN Sunucusu üzerinde ikincil analiz yürütülebilir. NovaSeq 6000Dx, iş akışına bağlı olarak farklı ikincil analiz uygulamaları kullanır. DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması için işleme, çoğullama çözme, FASTQ dosya oluşturma, hizalama, varyant arama ve varyant arama formatı (VCF ve gVCF) dosyalarının oluşturulmasını içerir. VCF ve gVCF dosyaları, bir referans genomunda belirli konumlarda bulunan germ hattı veya somatik varyantlar (seçilen iş akışına bağlı olarak) hakkında bilgi içerir.

Çift Çalışma Modu

NovaSeq 6000Dx, ayrı *in vitro* tanı amaçlı (IVD) ve sadece araştırma amaçlı (RUO) modlarına sahip tek bir önyükleme sabit diski içerir. Mod, Sequencing (Sekanslama) ekranındaki bir anahtar kullanılarak seçilir. Seçilen mod tüm ekranlarda arayüzde açıkça etiketlenir. Germ hattı ve/veya somatik iş akışlarındaki DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması da dahil olmak üzere IVD sekanslama testleri IVD modunda yürütülür. IVD modunda sadece IVD sekanslama reaktifleri kullanılabilir. NovaSeq 6000Dx için performans özellikleri ve prosedür sınırlamaları IVD modunda DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması kullanılarak belirlenmiştir.

Prosedür Kısıtlamaları

1. Sadece *in Vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.

2. DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ile birlikte kullanıldığında şunları sağlayabilir:
 - Sekanslama çıktısı:
 - S2 kiti ile $\geq 1,0$ terabaz (TB)
 - S4 kiti ile $\geq 3,0$ TB
 - Okuma uzunluğu (çift sonlu çalıştırmada) 2 x 150 baz çifti (bp).
 - 2 x 150 bp okuma uzunluğunda Q30 \geq %85'ten yüksek bazlar. Temel aramaların %85'ine eşit veya daha fazlası, Phred ölçeği kalite skorlarının 30'dan büyük olup, temel arama doğruluğunun %99,9'dan yüksek olduğunu gösterir.
3. >18 bp uzunluk insersiyonları ve > 21 bp uzunluk delesyonları doğrulanmamıştır.
4. Çoklu nükleotid varyantları (MNV) ve büyük insersiyon/delesyonlar dahil olmak üzere büyük varyantlar, çıktı VCF dosyasında ayrı ayrı daha küçük varyantlar olarak raporlanabilir.
5. Küçük MNV'ler çıktı VCF dosyasında ayrı varyantlar olarak rapor edilir.
6. Delesyonlar VCF dosyasında, VCF biçimine göre önceki bazın koordinatında raporlanır. Dolayısıyla, bağımsız bir baz aramayı homozigot referans olarak raporlamadan önce bitişik varyantları değerlendirin.
7. Germ hattına özgü kısıtlamalar:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ hattı FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışını kullanan NovaSeq 6000Dx, germ hattı varyant arama (örn. homozigot, heterozigot, yabancı tip) için niteliksel sonuçlar sağlamak üzere tasarlanmıştır.
 - Kopya sayısı varyasyonu, bir varyantın homozigot veya heterozigot olarak tanımlanmasını etkileyebilir.
 - Sistem, kopya sayısı varyasyonu varlığında bile tek bir lokusta ikiden fazla varyant bildirmeyecektir.
8. Somatiğe özgü kısıtlamalar:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Somatic FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışını kullanan NovaSeq 6000Dx, somatik varyant arama (yani bir somatik varyantın varlığı) için nitel sonuçlar sağlamak üzere tasarlanmıştır.
 - Somatic FASTQ ve VCF oluşturma analizi iş akışı germ hattı ve somatik varyantları ayırt edemez. İş akışı, geniş bir varyant frekansı yelpazesinde varyantları saptamak için tasarlanmıştır ancak varyant frekansı somatik varyantları germ hattı varyantlarından ayırmak için kullanılamaz.
 - Numunedeki normal doku, varyantların saptanmasını etkiler. Raporlanan saptama sınırı, hem tümör dokusundan hem de normal dokudan ekstrakte edilen toplam DNA'ya nispeten varyant frekansına bağlıdır.
 - Aynı lokusta birden fazla varyant alel adlandırılırsa, alellerin hiçbiri geçer varyantlar olarak rapor edilmeyecektir. Bunun yerine, tüm alel seti rapor edilecek ancak multiallelik etiket ile filtrelenecektir.

Kalite Kontrol Prosedürleri

NovaSeq 6000Dx yazılımı her çalıştırma, numune ve baz aramayı kalite kontrol metriklerine göre değerlendirir. Kitaplık hazırlığında pozitif ve negatif kontroller önerilir ve değerlendirilmelidir. Kontrolleri şu şekilde değerlendirin:

- Negatif Kontrol (Şablonsuz Kontrol) veya diğer negatif kontrol — Beklenen sonucu oluşturmaldır. Negatif kontrol beklenenden farklı bir sonuç oluşturursa numune izlemede olası bir hata, dizinleme primerlerinin hatalı kaydı veya kontaminasyon meydana gelmiştir.
- Pozitif Kontrol Numunesi — Beklenen sonucu oluşturmaldır. Pozitif kontrol beklenenden farklı bir sonuç oluşturursa numune izlemede olası bir hata veya dizinleme primerlerinin hatalı kaydı meydana gelmiştir.

Ürün Bileşenleri

Illumina NovaSeq 6000Dx aşağıdakilerden oluşur:

- NovaSeq 6000Dx Aleti (Katalog No 20068232)
- NovaSeq 6000Dx Aleti için yazılım bileşenleri aşağıdakileri içerir:

Yazılım Uygulaması	Kurulum Konumu	İşlev	Açıklama
NovaSeq İşletim Yazılımı	NovaSeq 6000Dx	Cihaz çalışmasını denetler	NovaSeq İşletim Yazılımı (NVOS), sekanslama esnasında cihazın çalışmasını yönetir ve Real-Time Analysis (RTA) yazılımı tarafından kullanılmak üzere görüntüler oluşturur.
Real-Time Analysis Software (RTA)	NovaSeq 6000Dx	Birincil analizi gerçekleştirir	RTA yazılım uygulaması, sekanslama çalıştırmasının her bir döngüsünde her kutucuk için NVOS tarafından oluşturulan görüntüleri, baz arama dosyalarına dönüştürür. Baz arama dosyaları, NovaSeq 6000Dx için Illumina DRAGEN Sunucusu üzerindeki Uygulama Modülleri için girişlerdir. RTA yazılım uygulaması bir kullanıcı arayüzü içermez.
Illumina Run Manager	Illumina DRAGEN Sunucusu	Denetim çalıştırma kurulumu ve yönetimi	Illumina Run Manager, kullanıcı ve cihaz yönetimi sağlar, uygulama yazılımını barındırır ve DRAGEN donanım ile hızlandırılmış genomik ikincil analiz modüllerinin kullanımını sağlar.

Çalışma Koşulları

Çalışma koşulları hakkında daha fazla bilgi için *NovaSeq 6000Dx Cihazı Ürün Belgeleri*, Çevresel Hususlar bölümüne bakın.

Öge	Spesifikasyon
Sıcaklık	Laboratuvar sıcaklığının 19 °C - 25 °C (22 °C ±3 °C) aralığında olmasını sağlayın. Bu sıcaklık, cihazın çalışma sıcaklığı aralığıdır. Çalışma esnasında ortam sıcaklığı değişiminin ±2 °C'den daha fazla olmasına izin vermeyin.
Nem	Yoğunlaşmayan bağıl nemin %20–80 olmasını sağlayın. Sistem 2.000 metre veya daha düşük bir çalışma yüksekliğinde çalıştırılmalıdır.

Sarf Malzemeleri ve Ekipman

Bu bölüm bir NovaSeq 6000Dx sekanslama çalışması için gereken her şeyi listeler. Bu, Illumina tarafından tedarik edilen sarf malzemelerini ve diğer tedarikçilerden satın almanız gereken yardımcı sarf malzemelerini ve ekipmanları içerir. Bu ögeler protokolü tamamlamak ve bakım ve sorun giderme prosedürlerini gerçekleştirmek için gereklidir.

Sarf malzemeleri veya sarf malzemesi ambalajı üzerindeki semboller hakkında bilgi için bkz. [Illumina IVD Sembol Anahtarı \(belge no. 1000000039141\)](#).

Sekanslama Sarf Malzemeleri

Bir NovaSeq 6000Dx çalışma aşağıdaki bileşenleri gerektirir:

- Tampon kartuşu
- Küme kartuşu
- Akış hücresi
- Kitaplık tüpü
- SBS kartuşu

NovaSeq 6000Dx sarf malzemeleri aşağıdaki konfigürasyonlarda paketlenmiştir. Her bileşen, doğru sarf malzemesi izleme ve uyumluluğu için radyo frekansı tanımlama (RFID) kullanır.

Tablo 1 Illumina Tarafından Tedarik Edilen Sarf Malzemeleri

Kit Adı	İçindekiler	Illumina Katalog Numarası
NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)	S2 küme kartuşu S2 akış hücresi S2 SBS kartuşu	20046931

Kit Adı	İçindekiler	illumina Katalog Numarası
NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)	S4 küme kartuşu S4 akış hücresi S4 SBS kartuşu	20046933
NovaSeq 6000Dx S2 Tampon Kartuşu	S2 tampon kartuşu	20062292
NovaSeq 6000Dx S4 Tampon Kartuşu	S4 tampon kartuşu	20062293
NovaSeq 6000Dx Kitaplık Tüpü	Tek Kitaplık tüpü	20062290
NovaSeq 6000Dx Kitaplık Tüpü, 24'lü Paket	24 Kitaplık tüpü	20062291

Sarf malzemelerinizi aldığınızda uygun performansı sağlamak için bileşenleri derhal belirtilen sıcaklıkta saklayın.



Tablo 2 NovaSeq 6000Dx Kit Saklama

Sarf Malzemesi	Miktar	Depolama Sıcaklığı	Uzunluk	Genişlik	Yükseklik
Akış hücresi	1	2 °C ila 8 °C	27,7 cm (10,9 inç)	17 cm (6,7 inç)	3,8 cm (1,5 inç)
Küme kartuşu	1	-25 °C ila -15 °C	29,5 cm (11,6 inç)	13 cm (5,1 inç)	9,4 cm (3,7 inç)
SBS kartuşu	1	-25 °C ila -15 °C	30 cm (11,8 inç)	12,4 cm (4,9 inç)	11,2 cm (4,4 inç)
Tampon kartuşu	1	15 °C ila 30 °C	42,2 cm (16,6 inç)	20,6 cm (8,1 inç)	21,1 cm (8,3 inç)
Kitaplık tüpü	1	15 °C ila 30 °C	4,1 cm (1,6 inç)	2,3 cm (0,9 inç)	12,4 cm (4,9 inç)

Sarf Malzemeleri Ayrıntıları

Uyumlu kit bileşenlerini tanımlamak için akış hücreleri ve kartuşlar kit modunu gösteren sembollerle etiketlenir.

Tablo 3 Uyumluluk Etiketleri

Kit Modu	Etiketlerdeki İşaret	Açıklama
S2 kit bileşenleri		S2 akış hücresi, 2 x 150 bp'de 1000 Gb'ye kadar çıkışa sahip 4,1 milyara kadar tek okuma geçişli filtre üretir. S2 akış hücresi çoğu yüksek verimli uygulama için hızlı sekanslama sağlar.
S4 kit bileşenleri		S4 akış hücresi, 2 x 150 bp'de 3000 Gb'ye kadar çıkışa sahip 10 milyara kadar tek okuma geçişli filtre üretir. S4 akış hücresi akış hücresinin dört şeritli bir versiyonudur ve maksimum çıkış için tasarlanmıştır.

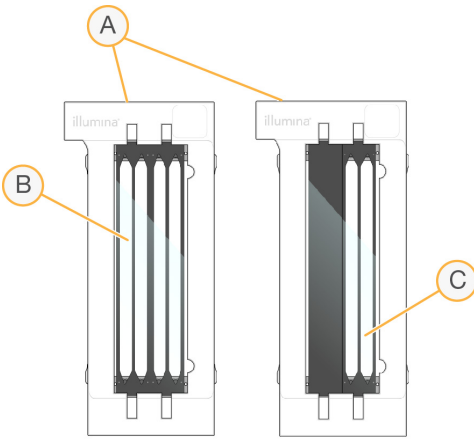
Akış Hücresi

NovaSeq 6000Dx akış hücresi bir akış hücresi kartuşunda tutulur. Akış hücresi, sipariş edilen bir düzenlemede milyarlarca nano kuyu ihtiva eden cam bazlı bir substrattır. Nanokuyularda kümeler oluşturulur ve daha sonra sekanslama gerçekleştirilir.

Her akış hücresinin havuzlanmış kitaplıkları sekanslamak için birden fazla şeridi vardır. S2 akış hücresinin iki yolu, S4 akış hücresinin dört yolu vardır. Her şerit birden fazla sürüntüde görüntülenir ve yazılım daha sonra her eğimin görüntüsünü kutucuk adı verilen daha küçük bölümlere böler.

Akış hücresindeki bazı çizikler ve diğer küçük kozmetik kusurlar normaldir ve veri kalitesini ve verimi tehlikeye atması beklenmemektedir. Illumina bu akış hücrelerinin normal şekilde kullanılmasını önerir.

Şekil 1 Akış Hücreleri



- A. Akış hücresi kartuşu
- B. Dört şeritli akış hücresi (S4)
- C. İki şeritli akış hücresi (S2)

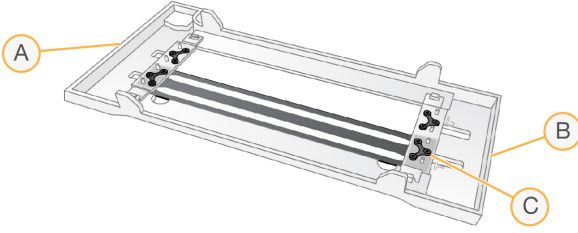
Her akış hücresinin alt tarafında birden fazla conta bulunur. Kitaplık ve reaktifler akış hücresi şeritlerine akış hücresinin giriş ucundaki contalardan girer. Kullanılmış reaktifler çıkış ucundaki contalardan şeritlerden dışarı atılır.



DİKKAT

Akış hücresini kullanırken contalara dokunmaktan kaçının.

Şekil 2 Ters Akış Hücresi





- A. Çıkış ucu
- B. Giriş ucu
- C. Conta (dört taneden biri)


Tampon, Küme ve SBS Kartuşu Ayrıntıları

NovaSeq 6000Dx tamponu, küme ve SBS kartuşları reaktifler, tamponlar ve yıkama çözeltisi ile önceden doldurulmuş folyo mühürlü haznelere sahiptir. Küme ve SBS kartuşları NovaSeq 6000Dx reaktif kitlerine dâhildir. Tampon kartuşu ayrı satılır.

Kartuşlar doğrudan cihaza yüklenir ve yükleme hatalarını azaltmak için renk kodlu ve etiketlidir. Reaktif soğutucusu ve tampon çekmecelerindeki kılavuzlar doğru yönlendirmeyi sağlar.

Tablo 4 NovaSeq 6000Dx Kartuşları

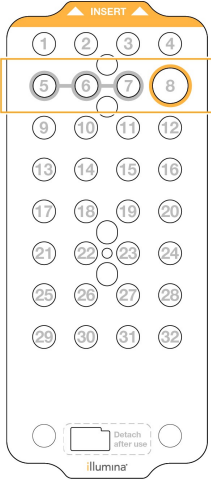
Sarf Malzemesi	Açıklama
Tampon kartuşu	Sekanslama tamponlarıyla önceden doldurulmuştur ve 6,8 kg'a (15 lb) kadar ağırlığa sahiptir. Plastik sap taşıma, yükleme ve boşaltma işlemlerini kolaylaştırır.
	Tampon kartuşu ışığa duyarlı reaktifler içerir. Kullanıma kadar tampon kabını pakette tutun.
Küme kartuşu	Kümeleme, indeksleme ve eşleştirilmiş uç reaktifleri ve yıkama çözeltisi ile önceden doldurulmuştur. Kitaplık tüpü için belirlenmiş bir pozisyon içerir. Turuncu etiket, küme kartuşunu SBS kartuşundan ayırır.
	Pozisyon No 30'daki bir denatürasyon reaktifi, organik bir amid ve üreme toksini olan formamid içerir. Tüm kullanılmamış reaktiflerin güvenli bir şekilde bertaraf edilmesini kolaylaştırmak üzere bu hazne çıkarılabilir.

Sarf Malzemesi	Açıklama
SBS kartuşu	Kitin desteklediği döngü sayısına özgü hacimlerde dizileme reaktifleri ile önceden doldurulmuştur. Üç reaktif pozisyonunun her biri, çalışma sonrası otomatik yıkama için ayrılmış bitişik bir konuma sahiptir. Gri etiket SBS kartuşunu küme kartuşundan ayırır.
	SBS kartuşu ışığa duyarlı reaktifler içerir. SBS kabını kullanıma kadar paketlenmiş halde tutun.

Rezerve Küme Kartuş Hazneleri

Özel primerler için üç hazne ayrılır ve kitaplık tüpü için boş bir pozisyon ayrılır. Örnek izlenebilirliği için kitaplık tüpü, çalışma kurulumu sırasında küme kartuşuna yüklenir ve çalışmanın sonuna kadar kartuşla birlikte kalır.

Şekil 3 Numaralandırılmış Hazneler



Tablo 5 Küme Kartuş Hazneleri

Konum	Şunun İçin Ayrıldı:
5, 6 ve 7	İsteğe bağlı özel primerler
8	Kitaplık tüpü

Kullanıcı Tarafından Tedarik Edilen Sarf Malzemeleri ve Ekipman

Tablo 6 Sarf Malzemeleri

Sarf Malzemesi	Tedarikçi	Amaç
Santrifüj şişesi, 500 ml	Genel laboratuvar tedarikçisi	Bakım yıkaması için Tween 20'nin seyreltilmesi.

Sarf Malzemesi	Tedarikçi	Amaç
Santrifüj tüpü, 30 ml	Genel laboratuvar tedarikçisi	Bakım yıkaması için NaOCl'nin seyreltilmesi.
Tek kullanımlık eldivenler, pudra içermeyen	Genel laboratuvar tedarikçisi	Genel amaçlı.
İzopropil alkollü mendiller, %70 veya Etanol alkollü mendiller, %70	VWR, katalog no 95041-714 veya eşdeğeri Genel laboratuvar tedarikçisi	Çalışmadan önce bileşenlerin temizlenmesi ve genel amaç.
Laboratuvar mendili, çok hav bırakmayan	VWR, katalog no 21905-026 veya eşdeğeri	Akış hücresi aşamasının kurutulması ve genel amaç.
Reaktif sınıfı NaOCl, %5	Sigma-Aldrich, katalog No 239305	Bakım yıkaması yapma.
Pipet uçları, 2 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi	Kitaplıkları seyreltme ve yüklemek için pipetleme.
Pipet uçları, 20 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi	Kitaplıkları seyreltme ve yüklemek için pipetleme.
Pipet uçları, 200 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi	Kitaplıkları seyreltme ve yüklemek için pipetleme.
Pipet uçları, 1000 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi	Kitaplıkları seyreltme ve yüklemek için pipetleme.
Reaktif veya spektrofotometrik sınıf izopropil alkol (%99), 100 ml şişe	Genel laboratuvar tedarikçisi	Optik bileşenlerin periyodik olarak temizlenmesi ve objektif temizleme kartuşunun desteklenmesi.
Tween 20	Sigma-Aldrich, katalog no P7949	Bakım yıkaması yapma.
Su, laboratuvar sınıfı	Genel laboratuvar tedarikçisi	İdame yıkama için Tween 20 ve sodyum hipokloritin seyreltilmesi.

Tablo 7 Ekipman

Kalem	Kaynak
Dondurucu, -25 °C ila -15 °C	Genel laboratuvar tedarikçisi
Dereceli silindir, 500 ml, steril	Genel laboratuvar tedarikçisi

Kalem	Kaynak
Buz kovası	Genel laboratuvar tedarikçisi
Pipet, 20 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi
Pipet, 200 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi
Pipet, 1000 µl	Genel laboratuvar tedarikçisi
Buzdolabı, 2 °C ila 8 °C	Genel laboratuvar tedarikçisi
Küvet, su banyoları*	Genel laboratuvar tedarikçisi

* İki reaktif kartuşu ve uygun su seviyesi alabilen bir küvet kullanın. Örneğin, (61 cm x 91,4 cm x 25,4 cm)(24 inç x 36 inç x 10 inç).

Laboratuvar Sınıfı Su Yönergeleri

Cihaz prosedürlerini gerçekleştirmek için her zaman laboratuvar sınıfı su veya deiyonize su kullanın. Hiçbir durumda musluk suyu kullanmayın. Aşağıdaki su sınıflarını ya da eşdeğerlerini kullanın:

- Deiyonize su
- Illumina PW1
- 18 Megohm (MΩ) su
- Milli-Q su
- Super-Q su
- Moleküler biyoloji sınıfı su

Kullanım Talimatları

Aşağıdaki talimatlar, S2 veya S4 kit yapılandırmalarını kullanarak NovaSeq 6000Dx Aleti'ni IVD çalışma modunda çalıştırmak içindir.

Bir Sekanslama Çalışması Oluştur

IVD veya RUO modunda Illumina Run Manager kullanarak bir çalışma oluşturmak için aşağıdaki adımları kullanın. Alternatif olarak, Runs (Çalıştırmalar) sayfasının Planned (Planlanan) sekmesinde **Import Run** (Çalıştırmayı İçe Aktar) ögesini seçin ve bir örnek sayfayı içe aktarın. Cihazda veya ağa bağlı bir bilgisayardaki bir tarayıcıyı kullanarak Illumina Run Manager'e erişerek yeni çalıştırmalar oluşturun.

NOT Her bir analiz uygulamasının gerektirdiği kesin bilgiler farklıdır ancak bir çalışma oluşturma süreci aşağıdaki adımları içerir.

1. Runs (Çalıştırmalar) ekranının Planned (Planlanan) sekmesinden, **Create Run** (Çalıştırma Oluştur) ögesini seçin.

2. Bir uygulama seçin ve ardından **Next** (İleri) ögesini seçin.
3. Ayarlar ekranlarında ilerleyin. Uygulamanıza bağlı olarak, görüntülenen ekranlar aşağıdakileri içerebilir:
 - **Run Settings** (Çalıştırma Ayarları)—Çalıştırma parametrelerini girin.
 - **Sample Data** (Numune Verileri)—Numune verilerini manuel olarak veya numune bilgilerini içeren bir CSV dosyasını içe aktararak girin. Numune adları benzersiz olmalıdır.
 - **Analysis settings** (Analiz ayarları)—Analiz için ayarları girin.
4. Review (İnceleme) ekranında, çalıştırma bilgilerini inceleyin ve **Save** (Kaydet) ögesini seçin. Çalıştırma, Planned (Planlanan) sekmesindeki çalıştırmalar listesinin üst kısmına eklenir.

Sarf Malzemelerini Hazırlama

SBS ve Küme Kartuşlarının Çözdürülmesi

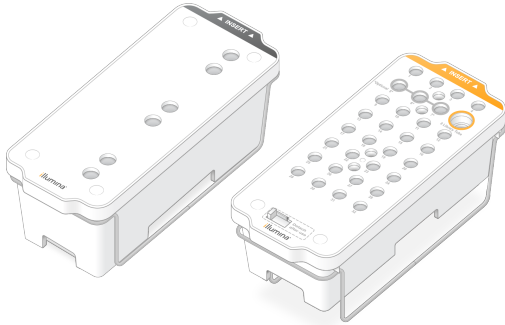


DİKKAT

Reaktifleri çözdürmek için sıcak su kullanmak, veri kalitesinde düşüğe veya çalışma arızasına neden olabilir.

1. Bir sekanslama çalışması devam ediyorsa çözdürme işlemi tamamlandığında aletin her iki tarafının da kullanılabilir olduğundan emin olun.
2. SBS ve küme kartuşlarını -25°C ila -15°C depolama alanından çıkarın.
3. Her kartuşu bir tel çözdürme rafına yerleştirin.
Raflar cihazla birlikte verilir ve su banyosunda devrilmeyi önler.

Şekil 4 Tel Çözdürme Raklarındaki Kartuşlar



4. Çözdürme süresini belirlemek için aşağıdaki tabloyu kullanın. SBS ve küme kartuşlarını aşağıdaki gibi oda sıcaklığında (19 °C ila 25 °C) su banyosunda çözün. Kartuşları yaklaşık yarıya kadar daldırın.

Kartuş	Çözdürme Süresi
S2 SBS kartuşu	4 saat
S2 küme kartuşu	2 saate kadar
S4 SBS kartuşu	4 saat
S4 küme kartuşu	4 saate kadar

**DİKKAT**

Reaktif kartuşlarının çözdürülmesinden sonraki dört saat içinde dizilemeye başlanmaması, veri kalitesinin düşmesine neden olabilir.

5. Kartuş tabanlarını kağıt havlu kullanarak iyice kurulayın. Kuyucuklar arasında tüm su giderilecek şekilde kurutun.
6. Folyo contalarda su olup olmadığını kontrol edin. Su varsa havsız kağıt mendille kurutun.
7. Haznelerde buz bulunmadığından emin olmak için her kartuşun alt kısmını inceleyin, bu da reaktiflerin çözdürüldüğünü gösterir.
8. Reaktifleri karıştırmak için her bir kartuşu 10 kez ters çevirin.

**DİKKAT**

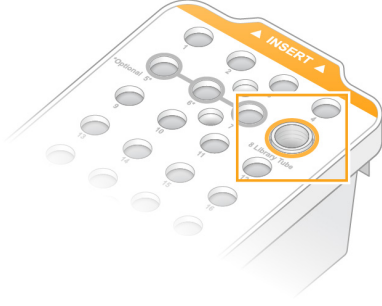
Kartuşların tamamen ters çevrilmemesi veri kalitesinde düşüşe neden olabilir.

9. Reaktiflerdeki hava kabarcıklarını azaltmak için her bir kartuşun tabanını nazikçe tezgaha vurun.

Kitaplık Tüpünü Yükle

- Altaki kitaplığı bozmadan, denatüre ve seyreltilmiş kitaplık havuzunu içeren kapaksız kitaplık tüpünü küme kartuşunun **Kitaplık Tüpü** konumuna (no 8) yerleştirin.
- Kitaplık tüpünü küme kartuşunun 8 numaralı pozisyonuna yerleştirin.

Şekil 5 Kapaksız Kitaplık Tüpü Pozisyon No 8'e Yüklendi

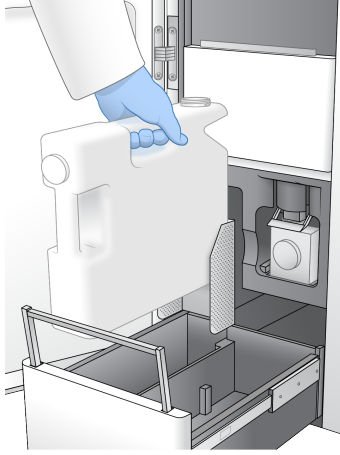


Kullanılmış Reaktif Şişelerini Boşalt

Her sekanslama çalışmasında kullanılan reaktif şişelerini boşaltmak için aşağıdaki talimatları kullanın. Sisteminiz kullanılmış reaktifleri harici olarak yönlendirecek şekilde yapılandırılmışsa küçük şişe kullanılmış reaktifleri toplar ve her dizileme çalışması için boşaltılmalıdır. Büyük şişe yerinde olmalıdır.

1. Kullanılan küçük reaktif şişesini aşağıdaki şekilde çıkarın ve boşaltın.
 - a. Kolu kaldırın ve kullanılan küçük reaktif şişesini oyuktan çıkarın. Şişeyi yanlarından tutun.
 - b. Yivli kapağı şişenin önündeki kapak tutucusundan çıkarın.
 - c. Dökülmeleri önlemek için şişe açıklığını kapakla kapatın.
 - d. İçeriği diğer şişenin içeriğinden ayrı tutarak bölgeniz için geçerli standartlara uygun olarak atın.
 - e. Kapaksız şişeyi oyuğa geri koyun ve ardından kolu indirin. Kapağı kapak tutucusunda saklayın.
2. Kullanılan büyük reaktif şişesini aşağıdaki gibi çıkarın ve boşaltın.
 - a. Üst kolu kullanarak kullanılan büyük reaktif şişesini tampon çekmecesinin sol tarafından çıkarın.
 - b. Yivli kapağı şişenin önündeki kapak tutucusundan çıkarın.
 - c. Dökülmeleri önlemek için şişe açıklığını kapakla kapatın.
 - d. İçeriği bölgeniz için geçerli standartlara uygun olarak atın. Boşaltma sırasında her iki sapı da kavrayın.
 - e. Kapaksız şişeyi tampon çekmecesine geri koyun. Kapağı kapak tutucusunda saklayın.

Şekil 6 Boş Şişeyi İade Etme



3. Yeni bir çift pudra içermeyen eldiven takın.

**DİKKAT**

Kullanılmış reaktif şişesini kullandıktan sonra daima yeni bir çift eldiven takın.

4. Tampon çekmecesini kapatın ve ardından sıvı bölmesi kapaklarını kapatın.

**DİKKAT**

Kullanılmış reaktif şişelerinin boşaltılmaması, sonlandırılmış bir çalıştırma ve taşmaya neden olabilir ve bu da cihaza zarar verir ve güvenlik riski oluşturur.

Akış Hücrelerini Hazırlayın

1. Yeni bir akış hücresi ambalajını 2 °C ila 8 °C depodan çıkarın.
2. Kapatılmış akış hücresi paketini ortam sıcaklığında (19 °C ila 25 °C) 10–15 dakikalığına bir kenara koyun.
Akış hücresini ambalajdan çıkardıktan sonraki 12 saat içinde kullanın.

Sarf Malzemelerini Yükleme

Çalışma kurulumunu başlatmak ve sarf malzemelerini yüklemek için aşağıdaki talimatları kullanın.

1. Ana menüden **Sequence** (Sekans) ögesini seçin ve ardından aşağıdaki gibi tek veya çift akış hücresi çalışmasını seçin.
 - **A+B**—Çift akışlı hücre çalışması kurun.
 - **A**—A tarafında tek bir akış hücresi çalışması kurun.
 - **B**—B tarafında tek bir akış hücresi çalışması kurun.Sistem, akış hücresinin yüklenmesinden başlayarak çalışma kurulumunu başlatır.
2. Uyarıyı onaylamak ve akış hücresi kapağını açmak için **OK** (Tamam) ögesini seçin.

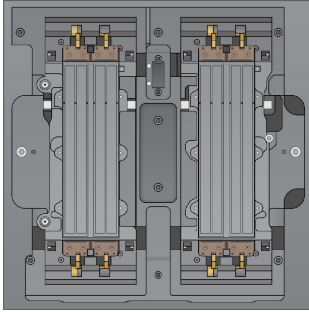
**DİKKAT**

Sekanslama çalışması sırasında yüzeyi temiz tutun ve cihaza yaslanmaktan kaçının. Akış hücresi kapağına basınç uygulanması onun açılmasına neden olabilir ve bu da çalışmayı durdurur. Durdurulan çalıştırmalar devam ettirilemez.

Akış Hücresinin Yükleme

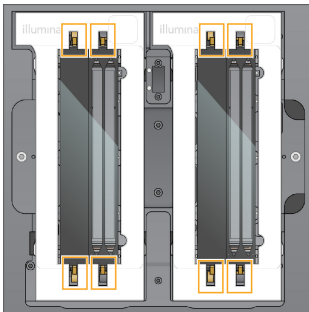
1. Varsa akış hücresini önceki çalışmadan çıkarın.
2. Akış hücresi aşamasında partikül görünüyorsa sıvı arabirimi ve optik hizalama hedefinin cam yüzeyi de dâhil olmak üzere tüm aşamayı alkollü bir bezle temizleyin. Havsız kağıt mendille kurulayın.

Şekil 7 Akış Hücresi Aşaması



3. Akış hücresini aşağıdaki gibi folyo ambalajdan çıkarın.
 - a. Akış hücresinin cam yüzeyinin kirlenmesini önlemek için yeni bir çift pudrasız eldiven takın.
 - b. Paket düz bir yüzey üzerindeyken folyoyu köşe tırnağından soyarak açın.
 - c. Akış hücresini kaplayan şeffaf plastik tutucuyu çıkarın.
 - d. Akış hücresini ambalajdan çıkarın. Cama veya alt taraftaki contactlara dokunmaktan kaçınmak için akış hücresini yanlardan tutun.
 - e. Cam yüzeylerden birinde partikül görünüyorsa ilgili yüzeyi havsız bir alkollü mendille temizleyin ve az havlı bir laboratuvar beziyle kurulayın.
 - f. Paketi uygun şekilde atın.
4. Akış hücresini dört yükseltilmiş klempten üzerinden hizalayın ve akış hücresi aşaması üzerine yerleştirin.

Şekil 8 Klempler Üzerinde Hizalanmış Yüklü Akış Hücreleri



5. **Close Flow Cell Door** (Akış Hücresi Kapağını Kapat) ögesini seçin.

Akış hücresi kapısı kapanır, sensörler ve RFID kontrol edilir ve akış hücresi kimliği ekranda görünür.

SBS ve Küme Kartuşlarını Yükleme

1. Sıvı bölmesi kapaklarını açın ve ardından reaktif soğutucu kapağını açın.
2. Önceki çalıştırmadan varsa kullanılmış SBS ve küme kartuşlarını çıkarın. Kullanılmış kartuşlarda delinmiş folyo contalar vardır.
3. Geçerli standartlar uyarınca kullanılmayan içerikleri imha edin. Küme kartuşunun 30 numaralı pozisyonunun güvenli bir şekilde atılması için, bkz. [Ayırma Pozisyonu No 30 sayfa 20](#).
4. Hazırlanan kartuşları reaktif soğutucusu çekmecesine aşağıdaki şekilde yükleyin, böylece Insert etiketleri cihazın arkasına bakar.
 - SBS kartuşunu (gri etiket) sol konuma yerleştirin.
 - Kapaksız kitaplık tüpünü içeren küme kartuşunu (turuncu etiket) doğru konuma yerleştirin.

Şekil 9 Yüklenen Reaktif Kartuşları



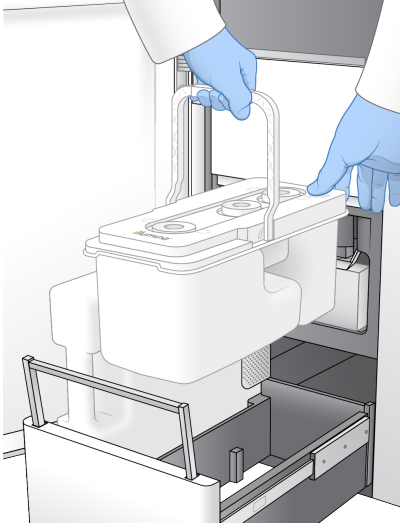
5. Yıkama tavasını durana dek reaktif soğutucunun içine kaydırın ve ardından reaktif soğutucu kapağını kapatın.

Sensörler ve RFID'ler kontrol edilir. Kitaplık tüpü ve iki kartuş için kimlikler ekranda görünür.

Tampon Kartuşunu Yükleme

1. Tampon çekmecesini açmak için metal kolu çekin.
2. Kullanılan tampon kartuşunu tampon çekmecesinin sağ tarafından çıkarın. Kullanılmış tampon kartuşunda delinmiş folyo mühürler vardır.
3. Etiket çekmecenin önüne bakacak şekilde Illumina tampon çekmecesine yeni bir tampon kartuşu yerleştirin. Kartuşu çekmece zeminindeki ve yanlarındaki yükseltilmiş kılavuzlarla hizalayın. Uygun şekilde yüklendiğinde tampon kartuşu eşit şekilde oturur ve çekmece kapanabilir.

Şekil 10 Tampon Kartuşunu Yükleme



4. Kullanılmış her iki reaktif şişesi de boşaltılmışsa kullanılmış her iki reaktif şişesinin de boş olduğunu onaylayan onay kutusunu seçin.

NOT Kullanılmış reaktif şişelerinin boşaltılmaması, sonlandırılmış bir çalıştırma ve taşmaya neden olabilir ve bu da cihaza zarar verir ve güvenlik riski oluşturur.

5. Sarf malzemeleri eklendiğinde devam etmek için **Run Selection** (Seçimi Çalıştır) ögesini seçin.

Çalıştırmayı Seç ve Başlat

Cihaz, kitaplık tüpü numarasını tarar ve eşleşen bir planlı çalıştırma arar.

1. Kullanılan her bir taraf için kitaplık tüpü numarasıyla eşleşen planlı bir çalışma bulunursa çalıştırma seçimi atlanır. Devam etmek için **Review** (İncele) ögesini seçin.
2. Taraflardan biri veya ikisi için eşleşen çalıştırma yoksa **Run Selection** (Çalıştırma Seçimi) ögesini seçin ve ardından bir veya daha fazla planlı çalışma seçin.
Aynı planlı çalıştırma her iki tarafta da seçilemez.
3. Bir veya daha fazla çalışma seçildiğinde, **Pre-Run Checks** (Çalıştırma Öncesi Denetimler) ögesini seçin.
4. Çalıştırma öncesi denetimin tamamlanması için yaklaşık 5 dakika bekleyin.
Başarıyla tamamlandıktan sonra çalıştırma otomatik olarak başlatılır.

NOT Sabit diskin aşırı doldurulmasını önlemek için, çalıştırma başladıktan sonra C:\ konumuna herhangi bir veri kopyalamayın.

Çalıştırma Öncesi Denetim Hataları

1. Çalıştırma öncesi denetimler akış hücresi algılanmaması gibi bir sensör hatası nedeniyle başarısız olursa, iş akışından çıkmalı ve iş akışını yeniden başlatmalısınız.
2. Diğer çalışma öncesi denetim hataları için, başarısız denetimi yeniden başlatmak için **Retry** (Yeniden Dene) ögesini veya tüm denetimleri yeniden başlatmak için **Retry All** (Tümünü Yeniden Dene) ögesini seçin. Çalıştırma başlamadan önce hataların çözülmesi gerekir.
3. Hata ayrıntılarını görmek için **Error** (Hata) simgesini seçin.
4. Hizalama denetimi başarısız olursa, hatayı aşağıdaki şekilde giderin.
 - a. **Reload** (Yeniden Yükle) ögesini seçin ve ardından Load (Yükle) ekranına dönmek için **OK** (Tamam) ögesini seçin.
 - b. Cihazın üst kısmındaki tüm öğeleri kaldırın ve ardından **OK** (Tamam) ögesini seçin. Akış hücresi kapağı açılır.
 - c. Akış hücresini yeniden yükleyin ve ardından **Run Setup** (Kurulumu Çalıştır) ögesini seçin.
 - d. Her bir RFID'yi tekrar okumak ve Pre-Run Checks (Çalıştırma Öncesi Denetimler) ekranına dönmek için her bir ekranda ilerleyin.
 - e. Kontrolü tekrar yapın.

Çalıştırma İlerleme Durumunu İzleme






Çalıştırma devam ederken Sekanslama ekranında aşağıdaki ayrıntılar görüntülenir. Sekanslama ekranına ana menüden erişilebilir.

- **Bireysel çalıştırma adımlarının durumu**
- **Time to completion** (Tamamlama zamanı)—Çalıştırmayı tamamlama tarihi ve saati (yyyy-aa-gg ss:dd).
- **Run progress** (Çalıştırma ilerleme durumu)—Mevcut çalıştırma adımı. İlerleme çubuğunun boyutu, her bir adımın çalıştırma hızı ile orantılı değildir.
- **Q Scores** (Q Skorları)—Kalite skorlarının (Q skorları) dağılımını.
- **Intensity** (Yoğunluk)—Her bir kutucuğun yüzde 90'lık küme yoğunluklarını gösterir. Çizim renkleri kırmızı ve yeşil kanalları gösterir.
- **Clusters passing filter (%)** (Filtreden Geçen Kümeler (%))— Filtreden geçen kümelerin yüzdesi.
- **Projected Total Yield (GB)** Öngörülen Toplam Verim (GB)—Akış hücresi çalıştırma için öngörülen verim. Şerit başına metrikler seçilirse (H), görüntülenen sayılar şerit başına geçerli verimdir ve çalıştırma boyunca döngü başına güncellenir.
- **Q30**—Q skoru ≥ 30 olan çalıştırma için baz aramalarının yüzdesi.

Durum Simgeleri

NVOS arayüzündeki bir durum simgesi çalıştırma durumunu gösterir. Simgedeki sayı, bir duruma ilişkin koşulların sayısını belirtir.

Bir çalıştırmanın durumu değiştiğinde simge yanıp söner. Koşulun bir açıklamasını görüntülemek için simgeyi seçin. Mesajı temizlemek için **Acknowledge** (Kabul Et) seçeneğini ve iletişim kutusunu kapatmak için **Close** (Kapat) seçeneğini seçin.

Durum Simgesi	Durum Adı	Açıklama
	Durum normal	Sistem normaldir.
	İşlemede	Sistem işlemededir.
	Uyarı	Bir uyarı oluştu ve dikkat edilmesi gerekiyor. Uyarılar çalıştırmanın durmasına neden olmaz ya da devam etmeden önce eylem gerçekleştirmenizi gerektirmez.
	Hata	Hata ortaya çıkmıştır. Hatalar, çalıştırmaya devam etmeden önce eylem gerçekleştirmenizi gerektirir.
	Bilgi	Kritik olmayan bir mesaj mevcuttur.

Çalıştırma Metrikleri

Yazılım çalışma sırasında oluşturulan ölçümleri görüntüler. Metrikler RTA3 tarafından oluşturulan ve InterOp dosyalarına yazılan verilere dayalı olarak çizimler, grafikler ve tablolar şeklinde görünür.

Kümeleme yaklaşık 2 saat sürer, ardından sekanslama 1. döngü ile başlar. Sekanslama ilerledikçe metrikler güncellenir. 26. döngüden sonra filtre, verim ve kalite skorlarını geçen gruplar mevcuttur. 26. döngüden önce hiçbir değer doldurulmaz ve geçerli değil olarak atanır.

Sekanslamadan Sonra

Aşağıdaki bölümlerde, sekanslama tamamlandıktan sonra gerçekleşen adımlarla ilgili talimatlar verilmektedir.

Çalıştırma Sonrası Otomatik Yıkama

Sekanslama tamamlandığında yazılım yaklaşık 80 dakika süren bir otomatik çalışma sonrası yıkama başlatır. Sistem, pozisyon No. 17'den %0,24 sodyum hipoklorit (NaOCl) pompalar ve %0,12'ye seyreltir. %0,12 NaOCl, ExAmp reaktif ve kitaplık pozisyonlarına, akış hücrelerinden ve ardından kullanılan reaktif şişelerine pompalanır. Yıkama, çapraz kontaminasyonu önlemek için şablonu sistemden temizler.

Yıkama tamamlandığında sistem güvenli bir duruma getirilir ve Ana Sayfa düğmesi etkin hâle gelir. Bir sonraki çalışmaya kadar sarf malzemelerini yerinde bırakın. Yıkamadan sonra sisteme hava girmesini önlemek için kamışlar SBS ve küme kartuşlarında kalır. Tampon kartuşundaki kamışlar kullanılan reaktif şişelerinin boşaltılabilmesi için yükseltilir. Yıkama tamponu daha sonra NaOCl ve reaktifleri sistemden uzaklaştırmak için tüm hatlardan pompalanır.

NOT Otomatik çalışma sonrası yıkama sırasında bir hata oluşursa ve çalışma sonrası yıkama tamamlanmazsa bir bakım yıkaması gereklidir.

Ayırma Pozisyonu No 30

Küme kartuşunun No 30 pozisyonundaki hazne formamid içerir. Kullanılmış küme kartuşundan çıkarılır ve ayrı olarak atılır.



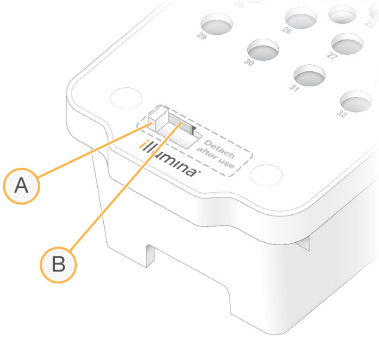
DİKKAT

Bu reaktif seti potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dâhil olmak üzere koruyucu ekipman giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. Ek çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için support.illumina.com/sds.html adresindeki SDS bölümüne bakın.

1. Eldiven takarken **Detach after use** (Kullanımdan sonra çıkar) etiketli beyaz plastik tırnağı sağa itin.
2. Rezervuarın altına bir el veya katı yüzey yerleştirin ve hazneyi küme kartuşunun altından serbest bırakmak için şeffaf plastik tırnağı etikete doğru bastırın Illumina.

NOT Saklama sırasında küme kartuşlarını istiflemekten kaçının. İstifleme, haznenin kazara ayrılmasına neden olabilir.

Şekil 11 30 Numaralı Konumda Çıkarılabilir



- A. Çıkarılacak beyaz plastik tırnak
- B. Serbest bırakmak için şeffaf plastik tırnak

3. Geçerli standartlar uyarınca hazneyi bertaraf edin.

Sekanslama Çıktısı

Sekanslama sırasında, veriler otomatik olarak NovaSeq 6000Dx Aleti'den Illumina DRAGEN Sunucusu'ne aktarılır. Birincil analiz ve veri aktarımı tamamlandığında, Illumina DRAGEN Sunucusu üzerindeki ikincil analiz, Illumina Run Manager içinde seçilen uygulama tarafından tanımlanan analiz seçeneklerini kullanarak otomatik olarak başlayabilir. Üretilen sonuçlar, çalışma kurulumu sırasında seçilen seçeneklere bağlıdır. Bir çalıştırmadan elde edilen sonuçları görüntülemek için, Runs (Çalıştırmalar) ekranındaki Completed (Tamamlandı) sekmesinden istenen çalıştırma adını seçin. Çıkış dosyalarını Instrument Settings (Cihaz Ayarları) ekranında belirtilen konumda da bulabilirsiniz.

Real-Time Analysis

NovaSeq 6000Dx Aleti, Bilgi İşlem Motorunda (CE) cihazındaki bir Real-Time Analysis yazılım uygulaması olan RTA3'i çalıştırır. RTA3, kameradan alınan görüntülerden yoğunluk ekstraksiyonu, baz araması gerçekleştirir, baz aramalarına bir kalite puanı atar, PhiX'e uyum sağlar ve InterOp dosyalarındaki verileri raporlar.

RTA3, işleme süresini optimize etmek için bilgileri bellekte depolar. RTA3 sonlandırılırsa işleme devam etmez ve bellekte işlenmekte olan tüm çalıştırma verileri kaybolur.

RTA3 Girişler

RTA3, işleme için kutucuk görüntülerinin yerel sistem belleğinde bulunmasını gerektirir. RTA3, NVOS'den çalıştırma bilgileri ve komutları alır.

RTA3 Çıktıları

Her renkli kanala ilişkin görüntüler RTA3'e bellekte kutucuklar olarak aktarılır. RTA3, bu görüntülerden bir dizi kalite skorlu baz arama dosyası ve filtre dosyası üretir. Diğer tüm çıktılar, destekleyici çıktı dosyalarıdır.

Dosya Türü	Açıklama
Baz arama dosyaları	Analiz edilen her bir kutucuk, bitleştirilmiş bir baz arama (*.cbcl) dosyasına dahil edilir. Aynı şerit ve yüzeyden elde edilen kutucuklar her bir şerit ve yüzey için bir CBCL dosyasında kümelendir.
Filtre dosyaları	Her bir kutucuk, bir kümenin filtrelerden geçip geçmediğini belirten bir filtre dosyası (*.filter) üretir.

RTA3, InterOp dosyaları olarak depolanan ve kutucuk, döngü ve okuma düzeyinde metriklerini içeren ikili bir çıktı olan çalıştırma kalitesinin gerçek zamanlı metriklerini sunar.

Hata İşleme

RTA3, günlük dosyaları oluşturur ve bu dosyaları Logs (Günlükler) klasörüne yazar. Hatalar, *.log dosya biçiminde bir metin dosyasına kaydedilir.

Aşağıdaki günlük dosyaları, işleme sonunda nihai çıktı hedefine aktarılır:

- `info_00000.log` önemli çalıştırma olaylarını özetler.
- `error_00000.log`, çalıştırma sırasında meydana gelen hataları listeler.
- `warning_00000.log`, çalıştırma sırasında meydana gelen uyarıları listeler.

Akış Hücresi Kutucukları

Kutucuklar, akış hücresindeki küçük görüntüleme alanlarıdır. Kamera, her bir yatağın bir görüntüsünü alır ve yazılım RTA3 işlemesi için bunları kutucuklara ayırır. Toplam kutucuk sayısı, akış hücresinde kaç şerit, yatak ve yüzeyin görüntülendiğine bağlıdır.

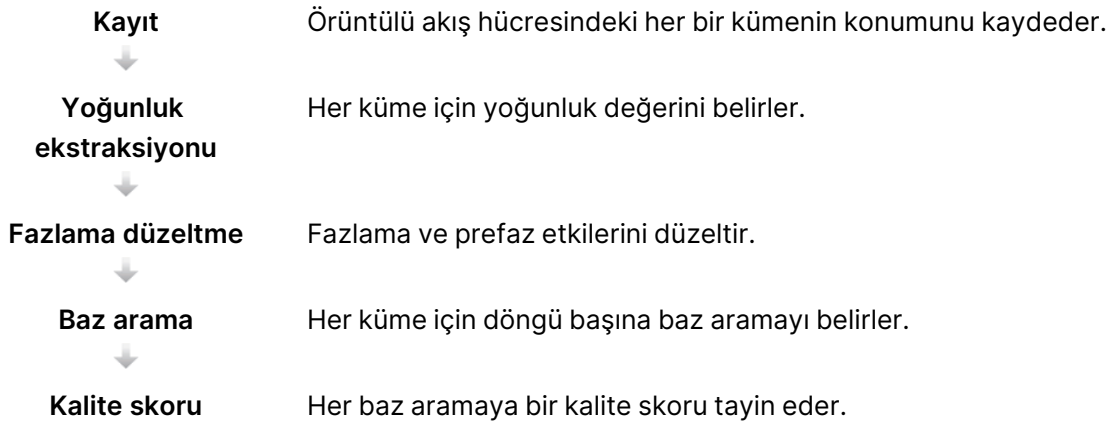
- S2 akış hücrelerinin toplam 1408 kutucuğu vardır.
- S4 akış hücrelerinin toplam 3744 kutucuğu vardır.

Akış Hücresi Bileşeni	S2	S4	Açıklama
Şeritler	2	4	Şerit, girdi ve çıktı portları olan fiziksel bir kanaldır.
Yüzeyler	2	2	S2 ve S4 akış hücreleri iki yüzeyde görüntülenir: üst ve alt. Bir kutucuğun önce üst yüzeyi görüntülenir.
Şerit başına yataklar	4	6	Yatak, kameranın tek bir taranmış görüntü olarak yakaladığı bir akış hücresi hattındaki bir sütundur.
Yatak başına düşen kutucuklar	88	78	Kutucuk, yatağın bir bölümü olup akış hücresinde görüntülenen bir alanı betimler.
Oluşturulan toplam kutucuk	1408	3744	Şeritler × yüzeyler × yataklar × yatak başına düşen kutucuklar, toplam kutucuk sayısına eşittir.

Kutucuk adı, akış hücresindeki kutucuk konumunu temsil eden beş haneli bir numaradır. Örneğin, kutucuk adı 1_1205 şerit 1, üst yüzey, yatak 2, kutucuk 5 anlamına gelir.

- İlk hane, şerit numarasıdır:
 - S2 akış hücresi için 1 veya 2.
 - S4 akış hücresi için 1, 2, 3 veya 4.
- İkinci hane yüzeyi temsil eder: üst için 1 veya alt için 2.
- Üçüncü hane, yatak numarasını temsil eder:
 - S2 akış hücresi için 1, 2, 3 veya 4.
 - S4 akış hücresi için 1, 2, 3, 4, 5 veya 6.
- Son iki hane kutucuk numarasını temsil eder. Numaralandırma akış hücresinin çıkış ucunda 01 ile başlar ve giriş ucunda 88 veya 78 ile biter.
 - S2 akış hücresi için 01 ila 88.
 - S4 akış hücresi için 01 ila 78.

Real-Time Analysis İş Akışı



Kayıt

Kayıt işlemi, bir görüntüyü örüntülü akış hücresindeki nanokuyuların döndürülen kare dizisine hizalar. Nanokuyuların sıralı olarak düzenlenmesi nedeniyle bir kutucuktaki her bir kümenin X ve Y koordinatları önceden belirlenir. Küme konumları, her bir çalıştırma için bir küme konumu (s.locs) dosyasına yazdırılır.

Döngüdeki herhangi bir görüntü için kayıt işlemi başarısız olursa söz konusu döngüdeki kutucuk için hiçbir baz arama oluşturulmaz.

Yoğunluk Ekstraksiyonu

Kayıt işleminin ardından yoğunluk ekstraksiyonu, belirli bir görüntüdeki her bir nanokuyu için bir yoğunluk değeri hesaplar. Kayıt başarısız olursa söz konusu kutucuk için yoğunluk ekstrakte edilemez.

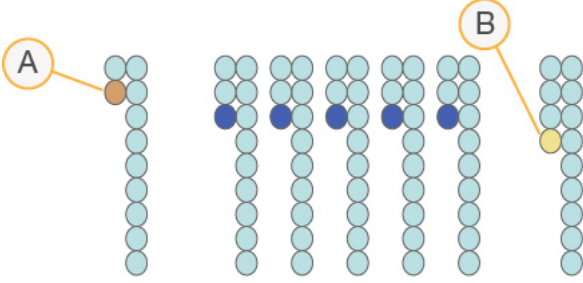
Fazlama Düzeltme

Sekanslama reaksiyonu sırasında bir kümedeki her DNA zinciri, döngü başına bir baz genişletilir. Fazlama ve prefaz, bir zincir geçerli birleşme döngüsü ile faz dışı hale geldiğinde gerçekleşir.

Fazlama, bir baz birleşmesi geride kaldığında gerçekleşir.

Prefaz, bir baz birleşmesi ileri geçtiğinde gerçekleşir.

Şekil 12 Fazlama ve Prefaz



- A. Fazlama gerçekleşen bir baz ile okuma
- B. Prefaz gerçekleşen bir baz ile okuma.

RTA3, fazlama ve prefazın etkilerini düzelterek çalıştırma boyunca her döngüde veri kalitesini en yüksek düzeye çıkarır.

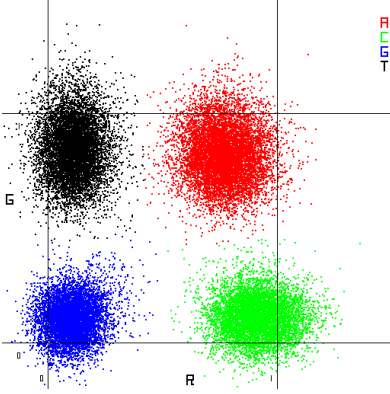
Baz Arama

Baz arama, belirli bir döngüde belirli bir kutucuğa ait her küme için bazı (A, C, G veya T) belirler. NovaSeq 6000Dx Aleti, iki kanallı sekanslama özelliğini kullanır; buna göre, dört DNA bazı için verileri kodlamak üzere bir görüntü yeşil kanaldan ve biri kırmızı kanaldan olmak üzere iki görüntü gerekir.

No call, N olarak tanımlanır. No call durumu bir küme filtreden geçmediğinde, kayıt başarısız olduğunda ya da bir küme kayarak görüntüden çıktığında meydana gelir.

Her bir kümenin yoğunlukları, kırmızı ve yeşil görüntülerden ekstrakte edilip birbirleri ile karşılaştırılır ve bunun sonucunda dört ayrı popülasyon elde edilir. Her bir popülasyon bir baza karşılık gelir. Baz arama işlemi, her bir kümenin hangi popülasyona ait olduğunu belirler.

Şekil 13 Küme Yoğunluklarını Görselleştirme



Tablo 8 2 Kanallı Sekanslamada Baz Aramaları

Baz	Kırmızı Kanal	Yeşil Kanal	Sonuç
A	1 (açık)	1 (açık)	Hem kırmızı hem yeşil kanalda yoğunluk gösteren kümeler.
C	1 (açık)	0 (kapalı)	Yalnızca kırmızı kanalda yoğunluk gösteren kümeler.
G	0 (kapalı)	0 (kapalı)	Bilinen bir küme konumunda yoğunluk göstermeyen kümeler.
T	0 (kapalı)	1 (açık)	Yalnızca yeşil kanalda yoğunluk gösteren kümeler.

Filtreden Geçen Kümeler

Çalıştırma sırasında, RTA3 veri kalitesi eşiğini karşılamayan okumaları kaldırmak üzere ham verileri filtreler. Üst üste gelen ve düşük kaliteli kümeler kaldırılır.

İki kanallı sekanslama için RTA3, bir baz aramanın saflığını (yoğunluk saflık ölçümü) belirlemek üzere popülasyon tabanlı bir sistem kullanır. Kümeler, ilk 25 döngüde en fazla bir baz aramada, saflık bir sabit eşiğin altında olduğunda filtreden geçer (PF). Dahil edildiğinde PhiX hizalaması, filtreden geçen kümelere ilişkin bir kutucuk alt kümesinde 26. döngüde gerçekleştirilir. Filtreden geçmeyen kümeler, baz aramasına ve hizalamaya tabi tutulmaz.

Kalite Skorları

Kalite skoru (Q skoru), hatalı bir baz araması olasılığına ilişkin tahmindir. Q skorunun daha yüksek olması, baz aramanın daha yüksek kalitede olduğunu ve doğru olmasının daha olası olduğunu belirtir. Q skoru belirlendikten sonra sonuçlar, CBCL dosyalarına kaydedilir.

Q skoru, küçük hata olasılıklarını kısa ve öz bir biçimde bildirir. Kalite skorları Q(X) şeklinde ifade edilir; burada X skordur. Aşağıdaki tabloda bir kalite skoru ile hata olasılığı arasındaki ilişki gösterilmektedir.

Q Skoru Q(X)	Hata Olasılığı
Q40	0,0001 (10.000'de 1)
Q30	0,001 (1000'de 1)
Q20	0,01 (100'de 1)
Q10	0,1 (10'da 1)

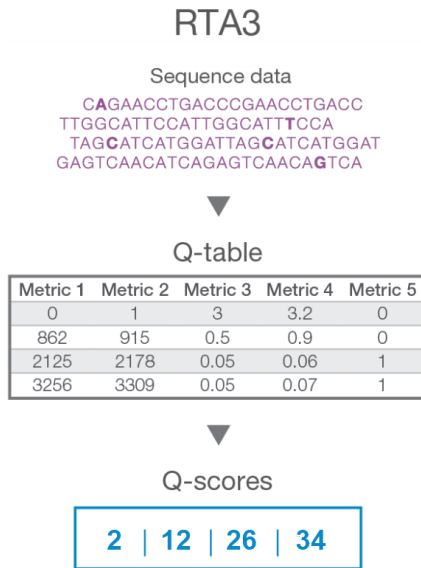
Kalite Skoru ve Raporlama

Kalite skoru, her bir baz arama için bir dizi tahmin unsurunu hesaplar ve ardından bu tahmin unsuru değerlerini kullanarak kalite tablosunda Q skorunu arar. Kalite tabloları, kimyasal versiyonu ve sekanslama platformunun belirli bir yapılandırması ile oluşturulan çalıştırmalara ilişkin optimum düzeyde doğru kalite tahminleri sunmak amacıyla tasarlanmıştır.

Kalite skoru, Phred algoritmasının değiştirilmiş bir versiyonunu temel alır.

NovaSeq 6000Dx Aleti için Q tablosu oluşturmak için bu belirli tahmini özelliklerin kümelemesine göre üç baz araması grubu tayin edilmiştir. Baz aramalarının gruplanmasının ardından ortalama hata oranı, üç grubun her biri için empirik olarak hesaplanmıştır ve karşılık gelen Q skorları, söz konusu grupla bağıntılı tahmini özelliklerin yanında Q tablosuna kaydedilmiştir. Bu kapsamda, RTA3 ile yalnızca üç Q skoru elde edilmesi mümkündür ve bu Q skorları, grubun ortalama hata oranını temsil eder. Genel olarak bu durum basitleştirilmiş ancak yine de yüksek düzeyde doğru kalite skorları elde edilmesini sağlar. Kalite tablosundaki üç grup, marjinal (< Q15), orta (~Q20) ve yüksek kaliteli (> Q30) baz çağrılarına karşılık gelir ve sırasıyla belirli 12, 26 ve 34 skorlarına atanmıştır. Ek olarak tüm no call'lar için null olan 2 skoru atanmıştır. Bu Q skoru raporlama modeli, doğruluğu veya performansı etkilemeden depolama alanını ve bant genişliği gerekliliklerini azaltır.

Şekil 14 RTA3 ile Basitleştirilmiş Q Skoru




Sekanslama Çıktısı Dosyaları

Dosya Türü	Dosya Açıklaması, Konumu ve Adı
Baz arama dosyaları	Analiz edilen her bir küme bitleştirilmiş baz arama dosyasına dâhil edilir ve döngü, şerit ve yüzey başına bir dosyada kümelenir. Kümelenmiş dosya, şeritteki her kümeye ilişkin baz aramayı ve şifrelenmiş kalite skorunu içerir. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, örneğin L001_1.cbcl
Küme konumu dosyaları	Her bir akış hücresi için ikili bir küme konumu dosyası bir kutucuktaki kümelerin XY koordinatlarını içerir. Akış hücresinin nanokuyu düzeni ile eşleşen altıgen bir düzen koordinatları önceden tanımlar. Data\Intensities s_[lane].locs
Filtre dosyaları	Filtre dosyası bir kümenin filtrelerden geçip geçmediğini belirtir. Filtre dosyaları 25 döngülük veri ile 26. döngüde oluşturulur. Her bir kutucuk için bir filtre dosyası oluşturulur. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[lane]_[tile].filter
Çalıştırma bilgileri dosyası	Çalıştırmanın adını, her bir okumadaki döngü sayısını, okumanın Dizin Okuması olup olmadığını ve akış hücresindeki yatak ve kutucuk sayısını listeler. Çalıştırma bilgileri dosyası, çalıştırmanın başlangıcında oluşturulur. [Root folder], RunInfo.xml
Küçük resim dosyaları	Okunan her sekanslamanın ilk döngüsü için küçük resim görüntüleri. Thumbnail_Images\L001\C[X.1]—Dosyalar her döngü için bir alt klasörde saklanır. s_[lane]_[tile]_[channel].jpg—Küçük resim, kutucuk numarasını içerir.

Sekanslama Çıktı Klasörü Yapısı

NVOS, çıktı klasörü adını otomatik olarak oluşturur.

 **Config** (Yapılandırma)—Çalıştırma için yapılandırma ayarları.


 **Logs** (Günlükler)—Çalışma adımlarını, cihaz analizini ve RTA3 olaylarını açıklayan günlük dosyaları.


 SampleSheet.csv—Numune sayfası veya varsa ekli diğer dosya.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]**—Baz arama dosyaları (*.cbcl), şerit, yüzey ve döngü başına bir dosyada kümelenir.

 s.locs—Çalıştırma için küme konumları dosyası.

- 📁 **InterOp**—İkili dosyalar.
- 📁 **Recipe** (Reçete)—Çalışmaya özel reçete dosyası.
- 📁 **Thumbnail Images** (Küçük Resim Görüntüleri)—Her 10. kutucuk için küçük resim görüntüleri.
- 📁 **LIMS**—Varsa çalışma kurulum dosyası (*.json).
- 📁 **Audit** (Denetim)
 - 📄 AuditInfo.xml
- 📄 RTA3.cfg
- 📄 RunInfo.xml
- 📄 RunParameters.xml
- 📄 RTAComplete.txt
- 📄 CopyComplete.txt
- 📄 SequenceComplete.txt
- 📄 IlluminaRunManagerCopyComplete.txt
- 📄 Manifest.tsv

Uyarılar ve Tedbirler



DİKKAT

Federal yasalar, bu cihazın kullanılmak ya da kullanılmasını sipariş etmek üzere yalnızca hekimler ya da faaliyet gösterdikleri Eyalet kanunlarına lisanslı olan diğer pratisyen hekimler tarafından veya bu hekimlerin siparişi üzerine satılması yönünde kısıtlama getirmektedir.

- **NovaSeq 6000Dx Aleti ile birlikte kullanılmak üzere Illumina tarafından sağlanan bazı bileşenler potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içermektedir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dâhil olmak üzere koruyucu ekipman giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın.** Ek çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için, support.illumina.com/sds.html adresindeki Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.
- Belirtilen prosedürlerin uygulanmaması hatalı sonuçlara veya numune kalitesinde belirgin azalmaya neden olabilir.
- Rutin laboratuvar tedbirlerini uygulayın. Ağzınızla pipetlemeyin. Belirlenmiş çalışma alanlarında yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini kullanırken tek kullanımlık eldiven takın ve laboratuvar önlüğü giyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini elledikten sonra ellerinizi iyice yıkayın.

- PCR ürünlerinin reaktifleri, cihazları ve genomik DNA numunelerini kontamine etmesini önlemek için uygun laboratuvar uygulamalarının ve iyi düzeyde laboratuvar hijyeninin sağlanması gerekir. PCR kontaminasyonu hatalı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine yol açabilir.
- Kontaminasyonun önüne geçmek için pre-amplifikasyon ve post-amplifikasyon alanlarında özel ekipmanların ve sarf malzemelerinin bulunduğundan emin olun (ör. pipetler, pipet uçları, ısı blokları, vorteks cihazları ve santrifüjler).
- Dizin-numune çifti, indeks plaka düzeni ile tam olarak eşleşmelidir. DNA Prep with Enrichment Application, çalıştırma kurulumu sırasında girildiğinde, numune adlarıyla ilişkili dizin primerlerini otomatik olarak doldurur. Kullanıcının sekanslama çalıştırmasını başlatmadan önce dizin primerlerinin numunelerle ilişkilendirildiğini doğrulaması tavsiye edilir. Numune ile plaka düzeni arasındaki uyumsuzluklar, pozitif numune tanımlamasının kaybına ve hatalı sonuç raporlamaya yol açar.
- Kurulum Bilgisayarı virüslere karşı korumak için kullanıcı tarafından tedarik edilen bir anti-virüs yazılımının kurulması kesinlikle tavsiye edilir.
- NovaSeq 6000Dx cihazını, herhangi bir paneli çıkarılmış şekilde çalıştırmayın. Cihazın panelleri çıkarılmış şekilde çalıştırılması hat gerilimine ve DC gerilimlerine maruziyet olasılığına neden olur.
- Akış hücresi bölmesindeki akış hücresi aşamasına dokunmayın. Bu bölmedeki ısıtıcı 22 °C ile 95 °C arasında çalışır ve yanıklara neden olabilir.
- Cihaz yaklaşık 1059 lb ağırlığındadır ve düşürülmesi ya da hatalı şekilde taşınması durumunda ciddi yaralanmalara neden olabilir.

Performans Özellikleri

Cihaz için performans NovaSeq 6000Dx özellikleri, kitaplık hazırlığı için Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, ve dizileme için ve germ hattı ve somatik varyant tespiti dahil olmak üzere NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ikincil DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analiz için Uygulama kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmalar arasında Numune Dizinleme, Numune Taşıma, DNA Girdisi, Analitik Duyarlılık (Kör Sınırı/Saptama Sınırı), Doğruluk, Kesinlik, Yöntem Karşılaştırma ve Tekrarlanabilirlik yer almıştır. Ekstraksiyon yöntemleri veya enterferan maddeler gibi pre-analitik faktörler ile ilgili performans özellikleri için *Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kullanım Talimatı*'ne bakın.

Performans Özelliklerinde Kullanılan Hesaplamaların Tanımları

1. Pozitif Yüzde Uyumu (PPA), testin doğru raporladığı ve referans yönteme göre varyant olarak sınıflandırılan loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $(\text{testin doğru şekilde raporladığı varyant loküsü sayısı}) / (\text{toplam varyant loküsü sayısı})$

Test tarafından raporlanan ve referans yöntemle uyumlu olan varyant loküsler gerçek pozitiflerdir (TP'ler). Test tarafından referans aramaları veya farklı varyant aramaları olarak raporlanan varyant loküsler yalancı negatiflerdir (FN'ler).

2. Negatif Yüzde Uyumu (NPA), testin doğru raporladığı ve referans yöntemle uyumlu olan yabani tip olarak sınıflandırılan loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $(\text{testin doğru şekilde raporladığı yabani tip loküsü sayısı}) / (\text{toplam yabani tip loküsü sayısı})$Test tarafından raporlanan ve referans yöntemle uyumlu olan yabani tip loküsler gerçek negatiflerdir (TN'ler). Test tarafından varyant olarak raporlanan yabani tip loküsler yalancı pozitiflerdir (FP'ler).
3. Genel yüzde uyumu (OPA), referans yöntemle nispeten test tarafından doğru raporlanmış loküslerin oranı olarak hesaplanır.
 - $((\text{testin doğru şekilde raporladığı varyant loküsü sayısı}) + (\text{testin doğru şekilde raporladığı yabani tip loküsü sayısı})) / ((\text{toplam varyant loküsü sayısı}) + (\text{toplam yabani tip loküsü sayısı}))$
4. PPA, NPA ve OPA hesaplamaları no call'ları (bir veya daha fazla kalite filtresini karşılamayan varyant veya referans loküsler) içermez.
5. Pozitif Arama Yüzdesi (PPC), saptanan varyantla yapılan gözlemlerin, geçersiz gözlemler veya düşük derinlikte filtrelenenler hariç olmak üzere test edilen toplam gözlem sayısına bölünmesiyle elde edilen gözlemlerin sayısıdır.
6. Negatif Arama Yüzdesi (PNC), geçersiz gözlemler veya düşük derinlikte filtrelenenler hariç olmak üzere, bir pozisyondaki sonuç olarak geçen gözlemlerin sayısının test edilen toplam gözlem sayısına bölünmesiyle hesaplanır.
7. Otozom Aranabilirlik Yüzdesi, genotip aramasından geçen otozomal kromozomlarda hedeflenen bölgelerdeki N olmayan referans pozisyonlarının yüzdesi olarak hesaplanır.

Numune Dizinleme

Kitaplık hazırlama sırasında eklenen numune dizin primerleri her bir numune DNA'sına benzersiz bir sekans atar. Bu benzersiz sekanslar, birden çok numunenin tek bir sekanslama çalıştırmasında havuzlanabilmesini sağlar. Numune dizinleme hem germ hattı hem somatik iş akışları kullanılır. Bu çalışmanın amacı, NovaSeq 6000Dx Aleti ile tek sekanslama çalıştırmasında işlenebilecek minimum (12) ve maksimum (192) numune sayısını belirlemektir. Oniki benzersiz Platinum Genome DNA numunesi (NA12877–NA12888), numune başına 12 farklı dizinleme primer kombinasyonu ile test edilmiştir. Numune kitaplıkları, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 baz içeren çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılarak hazırlanmıştır. DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ hattı FASTQ ve VCF oluşturma analizi iş akışı kullanılarak yapılan dört sekanslama çalışmasından elde edilen numune sonuçları, Platinum Genomes sürüm 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır.

İlk çalışma seti için, desteklenen maksimum dizin sayısını ve testin farklı dizinleme primer kombinasyonlarında belirli bir numune için tutarlı bir şekilde genotipleme araması yeteneğini doğrulamak için, her biri S2 ve S4 reaktifleriyle olmak üzere iki sekanslama çalışmasında 192 benzersiz dizinlenmiş numune kitaplığı

sekanslanmıştır. İkinci çalıştırma kümesi için, desteklenen minimum dizin sayısını doğrulamak üzere 12 adet benzersiz dizinlenmiş numune kitaplığı her biri S2 ve S4 reaktifleri içeren iki sekanslama çalıştırmasında sekanslanmıştır.

192 dizinli çalıştırmalarda, SNV'ler için PPA %99,7 ile %100 aralığında, insersiyonlar için PPA %100 ve delesyonlar için PPA %96,7 ile %100 aralığında ve NPA %100 olmuştur. 12 dizinli çalıştırmalarda, SNV'ler için PPA %99,7 ile %100 aralığında, insersiyonlar için PPA %89,6 ile %100 aralığında, delesyonlar için PPA %94,6 ile %100 aralığında ve NPA %100 aralığında olmuştur.

Numune Taşıma

NovaSeq 6000Dx Aleti, tek bir sekanslama çalıştırmasında birden fazla numunenin ve kontrolün sekanslanmasına olanak sağlar. Bir sekanslama çalıştırması dahilinde (çalıştırma içi) ve sekanslamalar arasında (çalıştırmadan çalıştırmaya) numune taşıma kapsamını değerlendirmek üzere bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Altısı erkek ve altısı kadın olmak üzere oniki Platinum Genome DNA numunesi, her iki cinsiyet kromozomu dahil olmak üzere 23 insan kromozomu genelinde 1.970.505 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanmış temsili bir test ile test edilmiştir. Kitaplıklar, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ hattı FASTQ ve VCF oluşturma analizi iş akışı kullanılarak NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde sekanslanmıştır. Erkek numunelerinin kadın numunelerine taşınması, kadın numunelerindeki Y kromozomu hedef okumalarının varlığı ile gözlemlenmiştir.

Çalıştırma içi taşıma; küme oluşturma, dizin döngüsü baz arama ve numune çoğullamasını çözme sırasında gerçekleştirilebilir. Bir sekanslama çalıştırması içinde numune taşınmasının test edilmesi için her benzersiz erkek ve kadın numunenin en az on iki tekrarından ve toplamda 192 benzersiz olarak dizinlenmiş kitaplık için iki şablonsuz kontrolden oluşan bir kitaplık havuzu, her biri S2 ve S4 reaktifleriyle olmak üzere NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde iki sekanslama çalıştırmasında sekanslanmıştır. Çalıştırma içi numune taşıma, her bir kadın kopyasının Y kromozomu hedef kapsamının, havuzdaki tüm erkek kopyalarının ortalama Y kromozomu hedef kapsamı ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Gözlemlenen çalıştırma içi taşımanın 95. yüzdelik dilimi, S2 ve S4 reaktifleri için sırasıyla %0,0090 ve %0,041 olmuştur.

Çalıştırmadan çalıştırmaya numune taşıma testi için iki kitaplık havuzu hazırlanmış ve bir NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde ardışık olarak A tarafı S4 reaktifleri kullanılarak ve B tarafı S2 reaktifleri kullanılarak sekanslanmıştır. İlk havuz, altı benzersiz kadın örneğinin en az on iki tekrarını ve toplamda 96 benzersiz olarak dizinlenmiş kitaplık için şablonsuz iki kontrolü içermiştir. İkinci havuz, toplam 96 benzersiz olarak dizinlenmiş kitaplık için altı benzersiz erkek örneğinin en az on iki tekrarı artı iki şablonsuz kontrol içermiştir. Her iki havuzda da aynı dizin adaptörleri kümesi kullanılmıştır. Kadın havuzu önce sekanslanmış, sonraki sekanslama çalıştırması erkek havuzu ile gerçekleştirilmiş ve daha sonra tekrar başka bir kadın havuzu sekanslama çalıştırması yapılmıştır. Çalıştırmadan çalıştırmaya numune taşıma, karşılık gelen kadın havuzu tekrar çalışmasının karşılık gelen kopyaları ile erkek havuz çalışmasının karşılık gelen kopyaları arasında Y kromozomu hedef kapsamı karşılaştırılarak reaktif tipi S2 ve S4 başına değerlendirilmiştir. Gözlemlenen çalıştırmadan çalıştırmaya taşımanın 95. yüzdelik dilimi S2 ve S4 reaktifleri için sırasıyla %0,0089 ve %0,012 olmuştur.

DNA Girdisi

Kan (Germ Hattı)

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasını kullanan Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti için kan DNA girdisi aralığı, NovaSeq 6000Dx için oluşturulmuştur. Bu, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanan temsili bir test ile sekiz Platinum Genome DNA numunesi (NA12877 – NA12884) kullanılarak bir seri seyreltme çalışması gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Kitaplıklar, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)'nin her birinin bir lotu kullanılarak bir NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde sekanslanmıştır.

1000 ng ile 10 ng (1000 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ve 10 ng) aralığındaki altı DNA girdisi düzeyinde yedi adet numune iki kopya halinde test edilmiştir. Sekizinci bir numune (NA12884), 10 ng girişte tek kopya olarak ve diğer tüm giriş seviyeleri için iki kopya halinde test edilmiştir. Doğruluğun belirlenmesi için, numune genotipleri Platinum Genomes sürüm 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar her bir giriş seviyesi için belirlenmiştir. Her varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) için PPA, [Varyant Türüne Göre Her Kan DNA Girdisi İçin PPA Sonuçları sayfa 32](#)'nda sunulmuştur. NPA, [Her Kan DNA Girdisi İçin NPA sayfa 33](#)'da sunulmuştur. Tüm girdi düzeylerinde benzer doğruluk görülmüştür. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx için önerilen kan DNA girdisi, NovaSeq 6000Dx üzerinde sekanslandığında performans özelliklerini karşılamak için üst ve alt limit sağlayan 1000 ng ve 10 ng ile 50-1000 ng'dir.

Tablo 9 Varyant Türüne Göre Her Kan DNA Girdisi İçin PPA Sonuçları

DNA Girdisi (ng)	Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA (%)
10	SNV	69612	69538	68	6	99,9
25		74192	74105	75	12	99,9
50		74105	74	13	99,9	
100		74116	72	4	99,9	
250		74113	72	7	99,9	
1000		74112	73	7	99,9	
10	İnsersiyon	2732	2732	0	0	100
25		2928	2916	6	6	99,8
50		2914	8	6	99,7	
100		2917	6	5	99,8	
250		2928	0	0	100	
1000		2921	5	2	99,8	

DNA Girdisi (ng)	Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA (%)
10	Delesyon	2084	2049	4	31	99,8
25		2240	2200	9	31	99,6
50		2207	3	30	99,9	
100		2199	1	40	>99,9	
250		2201	0	39	100	
1000		2195	2	43	99,9	

Tablo 10 Her Kan DNA Girdisi İçin NPA

DNA Girdisi (ng)	TN	FP	Referans No Call'lar	NPA (%)
10	115449045	384	285751	>99,9
25	123012157	415	438153	>99,9
50	122985299	369	465043	>99,9
100	122976660	321	473730	>99,9
250	122971099	331	479289	>99,9
1000	122978527	324	471882	>99,9

FFPE (Somatik)

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasını kullanan Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti için formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) DNA girdisi aralığı NovaSeq 6000Dx için oluşturulmuştur. Bu, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak üzere tasarlanan temsili bir test ile iki Platinum Genome numunesi kullanılarak bir seri seyreltme çalışması gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Kitaplıklar, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)'nin her birinin bir lotu kullanılarak bir NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde sekanslanmıştır.

Numune GM12877 DNA'sı sırasıyla yaklaşık %6,5 ve %13 varyant frekanslarında benzersiz GM12877 heterozigot ve homozigot varyantına sahip GM12877-13 oluşturmak üzere numune GM12878 DNA'sı ile seyreltilmiştir. Seyreltilmemiş GM12877 de test edilmiştir. 1000 ng ila 25 ng (1000 ng, 250 ng, 50 ng ve 25 ng) aralığındaki dört DNA girdisi seviyesinde GM12877-13 iki kopya halinde test edilmiştir. GM12877, 250 ng'da tek kopya olarak ve diğer tüm giriş seviyeleri için iki kopya halinde test edilmiştir. Doğruluğun belirlenmesi için, numune varyantı aramaları Platinum Genomes versiyon 2016-1.0 ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar her bir giriş seviyesi için belirlenmiştir. Her varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) için PPA, [Varyant Türüne ve Hedef VAF'ye Göre Her FFPE DNA Girdisi İçin PPA Sonuçları sayfa 34](#)'nda sunulmuştur. NPA, Her FFPE DNA Girdisi için [Her FFPE DNA Girdisi İçin NPA sayfa 34](#). Tüm girdi düzeylerinde benzer doğruluk görülmüştür. ΔCq değeri ≤ 5 olan FFPE numuneleri için, 1000 ng ve 25 ng'lik Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti için önerilen DNA girişi 50–1000 ng'dir ve NovaSeq 6000Dx üzerinde sekanslandığında performans özelliklerini karşılamak için bir üst ve alt sınır sağlar.

Tablo 11 Varyant Türüne ve Hedef VAF'ye Göre Her FFPE DNA Girdisi İçin PPA Sonuçları

DNA Girdisi (ng)	Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	Hedef Seyreltme VAF								
			0.065				0.13				
			TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA (%)	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA (%)
25	SNV	3000	2931	8	61	99,7	624	624	0	0	100
50		3000	2930	8	62	99,7	624	622	0	2	100
250		3000	2927	8	65	99,7	624	624	0	0	100
1000		3000	2921	8	71	99,7	624	624	0	0	100
25	İnsersiyon	96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
50		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
250		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
1000		96	96	0	0	100	48	48	0	0	100
25	Delesyon	88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
50		88	88	0	0	100	32	31	0	1	100
250		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100
1000		88	88	0	0	100	32	32	0	0	100

Tablo 12 Her FFPE DNA Girdisi İçin NPA

DNA Girdisi (ng)	Beklenen Yabani Tip	TN	FP	Referans No Call'lar	NPA (%)
25	25354119	25353706	413	5499498	>99,9
50	27538269	27538013	256	3315421	>99,9
250	21562303	21561983	320	1577958	>99,9
1000	29030903	29030596	307	1822781	>99,9

Analitik Duyarlılık (Kör Sınırı [LoB] ve Saptama Sınırı [LoD])

Bu çalışma, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının NovaSeq 6000Dx Aleti üzerindeki Somatik FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı için Kör Sınırı (LoB) ve Saptama Sınırını (LoD) değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışma, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 bazı kapsayan çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Platinum Genome hücre hatları GM12878 ve GM12877 formalinle fikse edilip parafine gömülmüş ve ardından DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. GM12877'nin GM12878'e seyreltileri, 489 benzersiz GM12877 varyantının (454 SNV, 17 insersiyon ve 18 delesyon) varyant sıklıklarının 0 ile 0,13 arasında değişeceği şekilde hacimce %0, %4, %6,5 ve %13 GM12877'den oluşan numuneler yapmak için hazırlanmıştır. Numune kitaplıkları iki lot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifi kullanılarak hazırlanmış ve toplam on iki sekanslama çalışması için iki NovaSeq 6000Dx Aleti ve her biri iki NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) lotu ile ardışık altı başlangıç günü boyunca sekanslanmıştır. Bu, her bir numune seyreltilsinde her bir varyant için 288 gözlem ile sonuçlanmıştır. LoB ve LoD, CLSI EP17-A2'de belirtilen klasik

yaklaşım kullanılarak hesaplanmıştır. LoB ve LoD, S2 ve S4 reaktifleri için her bir reaktif tipi için sekanslama çalışmasında tüm varyantların varyant frekansları birleştirilerek ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tip I hata 0,01 olarak tanımlanmıştır ve Tip II hata 0,05 olarak tanımlanmıştır.

LoB, her bir reaktif tipi (S2 veya S4) ve kitaplık hazırlığı için iki sekanslama lotunda bağımsız olarak 489 lokus için değerlendirilmiştir. S2 reaktifleri için 95. yüzdellik LoB %2,9'dur. S4 reaktifleri için, 95. yüzdellik LoB %2,2'dir.

LoD, S2 için 489 varyanttan 478'i ve S4 için 489 varyanttan 485'i için başarıyla hesaplanmıştır. Bir veya her iki kitaplık hazırlığı için LoD'nin belirlenmediği varyantlar, NovaSeq 6000Dx sistemi için LoD'nin nihai atamasının dışında tutulmuştur. NovaSeq 6000Dx sisteminin S2 ve S4 reaktifleriyle LoD'si, bireysel varyant LoD'lerinin 95. yüzdellik dilimi alınarak belirlenmiştir. S2 reaktifleri için, 478 varyant LoD'lerde 95. yüzdellik dilim %4,8'dir. S4 reaktifleri için, 485 varyant LOD'de 95. yüzdellik dilim %3,9'dur.

Doğruluk

Germ Hattı

Aşağıdaki çalışma, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) kullanılarak NovaSeq 6000Dx Aleti üzerindeki DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germline FASTQ ve VCF üretim analizi iş akışının varyant arama doğruluğunu değerlendirmek için yürütülmüştür. Dört benzersiz Platinum Genome DNA numunesi, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 bazı (9.232 hedef) kapsayan çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılarak test edilmiştir. Numunelerin her biri, 11'lik kopyalarda test edilen NA12880 dışında 12'lik kopyalarda test edilmiştir. Üç sekanslama cihazı, üç S2 reaktif lotu ve iki operatör ile birlikte altı başlangıç gününde toplam 18 çalıştırma gerçekleştirilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, Platinum Genomes sürüm 2016-1.0 ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

Tablo 13 Germ Hattı Uyumunun Özeti

Kriterler	Toplam Gözlemler ¹	Gözleme Sonucu ²	Çalıştırmaya göre Sonuç ³
SNV için PPA	846	99,8	99,9
İnsersiyonlar için PPA	846	97,9	>99,9
Delesyonlar için PPA	846	96,9	99,9
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹Çalıştırma başına numune sayısı (47) x Çalıştırma sayısı (18) = 846 olarak hesaplanmıştır.

²Tüm 18 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer.

³Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

[Numune Başına Germ Hattı Uyumu sayfa 37](#) varyant sonuçlarının PPA hesaplamaları için Platinum Genomes sürüm 2016-1.0 ile karşılaştırıldığı, numune bazında pozitif ve negatif yüzde uyumu ile sunulan çalışma verilerini içermektedir. Üç varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) birleştirilmiştir. Referans yöntem yalnızca tek nükleotid varyantları ve insersiyon/delesyonları için sonuçları sağladığından, varyant olmayan baz sonuçları NPA hesapları için insan genom referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılır.

Tablo 14 Numune Başına Germ Hattı Uyumu

Numune	Otozom Aranabilirliği	Beklenen Varyantlar ¹	TP	FN	Varyant No Call'lar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	99,4	273672	273452	220	0	414765131	931	99,9	>99,9	>99,9
NA12878	99,4	265680	265208	234	238	414803691	1193	99,9	>99,9	>99,9
NA12879	99,4	261792	261792	0	0	414746986	1429	100	>99,9	>99,9
NA12880	99,4	246114	245551	399	164	380157538	1458	99,8	>99,9	>99,9

¹ 18 çalıştırma genelinde tüm numune kopyalarındaki toplam varyant sayısı.

Varyant Türüne Göre Numune Başına Germ Hattı Uyumu sayfa 37, varyant sonuçlarının, iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında sunulan çalışma verilerini içermektedir. Saptama, her bir varyant türü için (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ayrı ayrı değerlendirilir. Referans konumlar hariç tutulur.

Tablo 15 Varyant Türüne Göre Numune Başına Germ Hattı Uyumu

Numune	SVN'ler			İnsersiyonlar			Delesyonlar		
	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN	Beklenen	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

Numuneler küçük insersiyon ve delesyonları (insersiyon/delesyon) aramak için ilaveten analiz edilmiştir. Genel bir özet, *Germ Hattı İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti sayfa 37* sunulmaktadır. Boyutları insersiyonlar için 1-18 bp, delesyonlar için 1-21 bp arasında değişen toplam 210 insersiyon/delesyon vardı.

Tablo 16 Germ Hattı İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA
İnsersiyon	36954	36953	1	0	>99,9
Delesyon	29358	28986	16	356	99,9

Temsili test, çeşitli genomik içerikleri kapsayan 9.232 hedeften oluşmuştur. Hedeflerin GC içeriği 0,20-0,86 aralığında olmuştur. Hedefler ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için kromozom bazında derlenen veriler [Germline Kromozom Düzeyinde Doğruluk sayfa 38](#) bölümünde sunulmuştur. Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve hatalı arama veya no call olması durumunda %100'den azdır.

Tablo 17 Germline Kromozom Düzeyinde Doğruluk

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinükleotit (22), Trinükleotit (8), İnsersiyon (18), Delesyon (4)	[0.22 - 0.8]; Medyan: 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), Dinükleotit (22), Trinükleotit (8), İnsersiyon (5), Delesyon (2)	[0.24 - 0.81]; Medyan: 0,44	132293464	798	460345	>99,9	0,35
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinükleotit (12), Trinükleotit (6), İnsersiyon (11), Delesyon (1)	[0.25 - 0.86]; Medyan: 0,45	114625053	2	226461	>99,9	0,20

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinükleotit (5), Trinükleotid (5), İnsersiyon (2), Delesyon (2)	[0.27 - 0.77]; Medyan: 0,45	61872303	0	66741	100	0,11
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinükleotit (10), Trinükleotit (8), İnsersiyon (8), Delesyon (18)	[0.29 - 0.79]; Medyan: 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), Dinükleotit (18), Trinükleotit (11), İnsersiyon (4), Delesyon (2)	[0.24 - 0.79]; Medyan: 0,48	103412695	1	182361	>99,9	0,18
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinükleotit (31), Trinükleotit (5), İnsersiyon (1), Delesyon (4)	[0.2 - 0.77]; Medyan: 0,46	132534074	19	246884	>99,9	0,19

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (9), İnsersiyon (4), Delesyon (1)	[0.26 - 0.78]; Medyan: 0,47	56247612	411	170925	>99,9	0,30
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinükleotit (9), Trinükleotit (9), İnsersiyon (4), Delesyon (1)	[0.27 - 0.83]; Medyan: 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), Dinükleotit (16), Trinükleotit (6), İnsersiyon (1), Delesyon (1)	[0.23 - 0.78]; Medyan: 0,44	55539058	1	188216	>99,9	0,34
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinükleotit (26), Trinükleotit (7), İnsersiyon (2), Delesyon (2)	[0.28 - 0.8]; Medyan: 0,47	75744222	742	259258	>99,9	0,34

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinükleotit (7), Trinükleotit (7), İnsersiyon (1), Delesyon (5)	[0.26 - 0.77]; Medyan: 0,49	99972530	1	542005	>99,9	0,54
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinükleotit (6), Trinükleotit (8), İnsersiyon (14), Delesyon (0)	[0.28 - 0.79]; Medyan: 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), Dinükleotit (6), Trinükleotit (6), İnsersiyon (4), Delesyon (1)	[0.29 - 0.77]; Medyan: 0,47	22286153	198	147895	>99,9	0,66
chr15	15	266	52091	Poly A (26), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (6), Trinükleotid (8), İnsersiyon (4), Delesyon (6)	[0.29 - 0.76]; Medyan: 0,46	43600279	0	99041	100	0,23

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (10), İnsersiyon (15), Delesyon (21)	[0.3 - 0.76]; Medyan: 0,54	65490245	16	1438278	>99,9	2,15
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinükleotit (13), Trinükleotit (6), İnsersiyon (18), Delesyon (16)	[0.28 - 0.82]; Medyan: 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), Trinükleotit (10), İnsersiyon (4), Delesyon (0)	[0.22 - 0.78]; Medyan: 0,44	15967171	312	42077	>99,9	0,26
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (7), İnsersiyon (2), Delesyon (21)	[0.33 - 0.83]; Medyan: 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), Trinükleotit (9), İnsersiyon (5), Delesyon (0)	[0.31 - 0.84]; Medyan: 0,53	28108712	0	38374	100	0,14

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinükleotit (5), İnsersiyon (2), Delesyon (5)	[0.22 - 0.78]; Medyan: 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), Dinükleotit (5), Trinükleotit (6), İnsersiyon (6), Delesyon (0)	[0.27 - 0.74]; Medyan: 0,51	30258131	0	42673	100	0,14
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinükleotit (5), Trinükleotit (23), İnsersiyon (3), Delesyon (0)	[0.2 - 0.72]; Medyan: 0,48	67318722	0	770544	100	1,13
chrY	0	40	5476	Poly A (11), Poly C (8), Poly T (11), Poly G (5), İnsersiyon (0), Delesyon (0)	[0.4 - 0.59]; Medyan: 0,45	0	0	0	Geçerli Değil	Geçerli Değil

Numune NA12878 için sekanslama sonuçları, National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) tarafından oluşturulan NA12878 için oldukça güvenilir bir genotip ile karşılaştırılmıştır. 9.232 hedef içerisinden, NIST sekansında 8.009 hedef tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 776 hedef kısmi örtüşme göstermiştir ve 447 hedef örtüşmemiştir. Bu, karşılaştırma için kopya başına 1.831.483 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları, [NIST Veritabanı ile NA12878 Numunesinin Germ Hattı Uyumu sayfa 44](#).

Tablo 18 NIST Veritabanı ile NA12878 Numunesinin Germ Hattı Uyumu

Numune	Kapsama dahil edilen hedef sayısı	Otozom Aranabilirliği	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	8785	99,4	247709	218	394262149	4584	>99,9	>99,9	>99,9

Bu 18 çalıştırılabilir Germ Hattı çalışmasıyla elde edilen verilere göre NovaSeq 6000Dx Aleti aşağıdakileri tutarlı bir şekilde sekanslayabilir:

- GC içeriği \geq %20 (%20 GC içerikli 1692 sekanslanan hedef bölgelerinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no call oranı %0 olmuştur)
- GC içeriği \leq %86 (%86 GC içeren 846 sekanslanan hedef bölgelerinde tüm aranan bazlar doğru aranmıştır, no call oranı %0 olmuştur)
- PolyA uzunlukları \leq 46 (46 PolyA tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların tümü %0,27 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- PolyT uzunlukları \leq 40 (40 PolyT tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların 13384321 tanesinden 13384074 tanesi %0,26 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- PolyG uzunlukları \leq 11 (11 PolyG tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların tümü %0 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- PoliC uzunlukları \leq 8 (8 PolyC tekrarı ile 5922 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların 9815035 tanesinden 9815030 tanesi %0,53 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- Dinükleotid tekrar uzunlukları \leq 31x (31 Dinükleotid tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgelerde bulunan çağrılan bazların 32233926 tanesinden 32233922 tanesi %0,21 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları \leq 23x (23 Trinükleotid tekrarı olan 846 sekanslanan hedef bölgeden tüm çağrılan bazlar %0,21 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- İnsersiyon uzunlukları \leq 18 (18 insersiyonlu 1692 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların tümü %7,71 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)
- Delesyon uzunlukları \leq 21 (21 Delesyonlu 1692 sekanslı hedef bölgede bulunan çağrılan bazların tümü %1,14 no-call oranı ile doğru çağrılmıştır)

Somatik

Burada açıklanan çalışma, NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) kullanılarak NovaSeq 6000Dx Aleti üzerindeki DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Somatik FASTQ ve VCF üretim analizi iş akışının varyant çağrı doğruluğunu değerlendirmek için kullanılmıştır.

Bu çalışmada, 23 insan kromozomunun tümü genelinde 1.970.505 bazı (9.232 hedef) kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılmıştır. Bu çalışmada, değerlendirme için dört benzersiz numune oluşturmak üzere FFPE uygulanmış bloklardan Platinum Genome DNA ekstrakte edilmiştir.

Numune GM12877 DNA'sı sırasıyla yaklaşık %6,5 ve %13 varyant frekanslarında benzersiz GM12877 heterozigot ve homozigot varyantına sahip GM12877-13 oluşturmak üzere numune GM12878 DNA'sı ile seyreltilmiştir. Numune GM12878 DNA'sı benzer şekilde sırasıyla yaklaşık %6,5 ve %13 varyant frekanslarında benzersiz GM12878 heterozigot ve homozigot varyantına sahip GM12878-13 oluşturmak üzere numune GM12877 DNA'sı ile seyreltilmiştir. Seyreltilmemiş GM12877 ve GM12878 de test edilmiştir. Numunelerin her biri, on bir kopya halinde test edilen seyreltilmemiş GM12878 dışında 12 kopya halinde test edilmiştir. Üç sekanslama cihazı, üç S4 reaktif lotu ve iki operatör ile birlikte altı başlangıç gününde toplam on sekiz çalıştırma gerçekleştirilmiştir. SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar için doğruluk, Platinum Genomes sürüm 2016-1.0 ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir.

Tablo 19 Somatik Uyumu Özeti

Kriterler	Gözlem Sayısı ¹	Gözleme Sonuçları ²	Çalıştırmaya göre Sonuç ³
Somatik SNV'ler için PPA	846	99,8	98,9
Somatik insersiyonlar için PPA	846	100	100
Somatik delesyonlar için PPA	846	100	100
NPA	846	>99,9	>99,9
OPA	846	>99,9	>99,9

¹ = Çalışma başına numune sayısı (47) x Çalıştırma sayısı (18) = 846 olarak hesaplanır.

² Tüm 18 çalıştırma genelinde numune kopyasına göre gözlemlenen en düşük değer.

³ Her bir çalıştırmadan elde edilen veriler toplu olarak analiz edildiğinde bulunan en düşük değer.

[Numune Başına Somatik Uyumu sayfa 45](#), varyant sonuçlarının PPA hesaplamaları için iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında pozitif ve negatif yüzde uyumu ile sunulan çalışma verilerini içermektedir. Üç varyant türü (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) birleştirilmiştir. Referans yöntem yalnızca tek nükleotid varyantları ve insersiyon/delesyonları için sonuçları sağladığından, varyant olmayan baz sonuçları NPA hesapları için insan genom referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılır.

Tablo 20 Numune Başına Somatik Uyumu

Numune	Otozom Aranabilirliği	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	95,4	96228	95022	198	1008	365425810	1203	99,8	>99,9	>99,9

Numune	Otozom Aranabilirliği	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	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

[Varyant Türüne Göre Numune Başına Somatik Uyumu sayfa 46](#), varyant sonuçlarının, iyi karakterize edilmiş birleşik referans yöntemiyle karşılaştırıldığı, numune bazında sunulan çalışma verilerini içermektedir. Saptama, her bir varyant türü için (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) ayrı ayrı değerlendirilir. Referans konumlar hariç tutulur.

Tablo 21 Varyant Türüne Göre Numune Başına Somatik Uyumu

Numune	SNV'ler			İnsersiyonlar			Delesyonlar		
	Beklenen	TP	FN	Beklenen	TP	FN	Beklenen	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

Dört numune küçük insersiyon ve delesyonları (insersiyon/delesyon) aramak için ilaveten analiz edilmiştir. Genel bir özet, [Somatik İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti sayfa 46](#) bölümünde sunulmaktadır. Boyutları insersiyonlar için 1-18 bp, delesyonlar için 1-21 bp arasında değişen toplam 210 insersiyon/delesyon vardı.

Tablo 22 Somatik İnsersiyon/Delesyon Saptama Özeti

Varyant Türü	Beklenen Varyantlar	TP	FN	Varyant No Call'lar	PPA
İnsersiyon	11772	11772	0	0	100
Delesyon	10098	9666	0	432	100

Temsili test, çeşitli genomik içerikleri kapsayan 9.232 hedeften oluşmuştur. Hedeflerin GC içeriği 0,20–0,86 aralığında olmuştur. Hedefler ayrıca bir dizi tek nükleotid (ör. PolyA, PolyT), dinükleotid ve trinükleotid tekrarları içermiştir. Genomik içeriğin doğru arama yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemek için kromozom bazında derlenen veriler [Somatik Kromozom Düzeyinde Doğruluk sayfa 47](#) bölümünde sunulmuştur. Doğru arama yüzdesi, varyant ve referans aramalardan oluşur ve hatalı arama veya no call olması durumunda %100'den azdır.

Tablo 23 Somatik Kromozom Düzeyinde Doğruluk

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr1	47	728	138328	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (14), Poly G (7), Dinükleotit (22), Trinükleotit (8), İnsersiyon (3), Delesyon (0)	[0.22 - 0.8]; Medyan: 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), Dinükleotit (22), Trinükleotit (8), İnsersiyon (5), Delesyon (1)	[0.24 - 0.81]; Medyan: 0,44	126795713	842	5850393	>99,9	4.4
chr3	38	650	137627	Poly A (18), Poly C (6), Poly T (18), Poly G (7), Dinükleotit (12), Trinükleotit (6), İnsersiyon (1), Delesyon (1)	[0.25 - 0.86]; Medyan: 0,45	109902527	593	4889226	>99,9	4.3

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr4	17	370	73766	Poly A (9), Poly C (7), Poly T (25), Poly G (6), Dinükleotit (5), Trinükleotit (5), İnsersiyon (0), Delesyon (1)	[0.27 - 0.77]; Medyan: 0,45	59373461	16	2517412	>99,9	4.1
chr5	25	507	90008	Poly A (10), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinükleotit (10), Trinükleotit (8), İnsersiyon (8), Delesyon (18)	[0.29 - 0.79]; Medyan: 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), Dinükleotit (18), Trinükleotit (11), İnsersiyon (0), Delesyon (1)	[0.24 - 0.79]; Medyan: 0,48	98593101	687	4890221	>99,9	4.7
chr7	21	450	161501	Poly A (27), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinükleotit (31), Trinükleotit (5), İnsersiyon (1), Delesyon (4)	[0.2 - 0.77]; Medyan: 0,46	126913574	104	5773856	>99,9	4.4

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr8	18	381	67775	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (13), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (9), İnsersiyon (4), Delesyon (0)	[0.26 - 0.78]; Medyan: 0,47	53430489	175	2958909	>99,9	5.2
chr9	23	347	87100	Poly A (12), Poly C (7), Poly T (27), Poly G (8), Dinükleotit (9), Trinükleotit (9), İnsersiyon (0), Delesyon (1)	[0.27 - 0.83]; Medyan: 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), Dinükleotit (16), Trinükleotit (6), İnsersiyon (0), Delesyon (0)	[0.23 - 0.78]; Medyan: 0,44	53209592	90	2469444	>99,9	4.4
chr11	29	511	91786	Poly A (28), Poly C (8), Poly T (21), Poly G (7), Dinükleotit (26), Trinükleotit (7), İnsersiyon (2), Delesyon (2)	[0.28 - 0.8]; Medyan: 0,47	72291795	150	3665560	>99,9	4.8

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr12	29	577	120365	Poly A (19), Poly C (8), Poly T (40), Poly G (7), Dinükleotit (7), Trinükleotit (7), İnsersiyon (0), Delesyon (3)	[0.26 - 0.77]; Medyan: 0,49	96109352	101	4331932	>99,9	4.3
chr13	13	283	58639	Poly A (24), Poly C (6), Poly T (12), Poly G (7), Dinükleotit (6), Trinükleotit (8), İnsersiyon (14), Delesyon (0)	[0.28 - 0.79]; Medyan: 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), Dinükleotit (6), Trinükleotit (6), İnsersiyon (4), Delesyon (0)	[0.29 - 0.77]; Medyan: 0,47	21336891	0	1078329	100	4.8
chr15	15	266	52091	Poli A (26), Poli C (7), Poli T (13), Poli G (6), Trinükleotid (8), İnsersiyon (4), Delesyon (0)	[0.29 - 0.76]; Medyan: 0,46	41918631	184	1753300	>99,9	4.0

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr16	21	366	80030	Poly A (7), Poly C (7), Poly T (15), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (10), İnsersiyon (15), Delesyon (21)	[0.3 - 0.76]; Medyan: 0,54	62344351	18	4540539	>99,9	6.8
chr17	36	645	118062	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (18), Poly G (8), Dinucleotide (13), Trinucleotide (6), Insertion (18), Delesyon (1)	[0.28 - 0.82]; Medyan: 0,49	93811318	414	4403622	>99,9	4,5
chr18	9	99	19195	Poli A (7), Poli C (7), Poli T (15), Poli G (6), Trinükleotid (10), İnsersiyon (0), Delesyon (0)	[0.22 - 0.78]; Medyan: 0,44	15007653	6	990633	>99,9	6.2
chr19	30	605	104004	Poly A (19), Poly C (7), Poly T (31), Poly G (7), Dinükleotit (5), Trinükleotit (7), İnsersiyon (2), Delesyon (3)	[0.33 - 0.83]; Medyan: 0,59	81416722	455	4860311	>99,9	5.6

Kromozom	Gen Sayısı	Hedef Sayısı	Baz Sayısı	Genomik İçerik	GC Aralığı	Doğru Aramalar	Hatalı Aramalar	No call'lar	Doğru Arama Yüzdesi	No call'lar Yüzdesi
chr20	12	179	33795	Poly A (6), Poly C (6), Poly T (7), Poly G (8), Trinükleotid (9), İnsersiyon (5), Delesyon (0)	[0.31 - 0.84]; Medyan: 0,53	26833936	7	1301905	>99,9	4,6
chr21	5	63	30642	Poly A (28), Poly C (6), Poly T (24), Poly G (7), Dinükleotit (5), İnsersiyon (1), Delesyon (0)	[0.22 - 0.78]; Medyan: 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), Dinükleotit (5), Trinükleotit (6), İnsersiyon (6), Delesyon (0)	[0.27 - 0.74]; Medyan: 0,51	28887217	86	1392179	>99,9	4,6
chrX	23	433	83576	Poly A (18), Poly C (8), Poly T (23), Poly G (9), Dinükleotit (5), Trinükleotit (23), İnsersiyon (3), Delesyon (0)	[0.2 - 0.72]; Medyan: 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), İnsersiyon (0), Delesyon (0)	[0.4 - 0.59]; Medyan: 0,45	0	0	0	Geçerli Değil	Geçerli Değil

Numune GM12878 için sekanslama sonuçları, National Institute of Standards and Technology (NIST) (v.2.19) tarafından oluşturulan NA12878 için oldukça güvenilir bir genotip ile karşılaştırılmıştır. 9.232 hedef içerisinde, NIST sekansında 8.009 hedef tamamen oldukça güvenli genomik bölgeler içinde olmuştur, 776 hedef kısmi örtüşme göstermiştir ve 447 hedef örtüşmemiştir. Bu, karşılaştırma için kopya başına 1.831.483 koordinatla sonuçlanmıştır. Varyant olmayan baz aramaları, insan genomu referans sekans yapısı hg19 ile karşılaştırılmıştır. Doğruluk sonuçları, [NIST Veritabanı ile GM12878 Numunesinin Somatik Uyumunu sayfa 53](#).

Tablo 24 NIST Veritabanı ile GM12878 Numunesinin Somatik Uyumunu

Numune	Kapsama dahil edilen hedef sayısı	Otozom Aranabilirliği	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	8785	94,5	247228	0	375073821	2043	100	>99,9	>99,9

Bu 18-çalıştırmalık Somatik çalışmasıyla elde edilen verilere göre NovaSeq 6000Dx Aleti aşağıdakileri tutarlı bir şekilde sekanslayabilir:

- GC içeriği \geq %20 (%20 GC içeriğine sahip 1692 sekanslı hedef bölgedeki tüm aranan bazlar no-call oranı %0,34 ile doğru olarak aranmıştır)
- GC içeriği \leq %86 (%86 GC içeriğine sahip 846 sekanslı hedef bölgedeki tüm aranan bazlar no-call oranı %4,21 ile doğru olarak aranmıştır)
- PolyA uzunlukları \leq 46 (46 PolyA tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların 14550083 tanesinden 14550082 tanesi %4,18 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- PolyT uzunlukları \leq 40 (40 PolyT tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların 12833491 tanesinden 12833489 tanesi %4,37 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- PolyG uzunlukları \leq 11 (11 PolyG tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların tümü %7,59 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- PoliC uzunlukları \leq 8 (8 PolyC tekrarı ile 5922 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların 9405615 tanesinden 9405604 tanesi %4,68 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- Dinükleotid tekrar uzunlukları \leq 31x (31 Dinükleotid tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgelerde bulunan aranan bazların 30996712 tanesinden 30996684 tanesi %4,04 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- Trinükleotid tekrar uzunlukları \leq 23x (23 Trinükleotid tekrarı ile 846 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların tümü %5,39 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)
- İnsersiyon uzunlukları \leq 18 (18 insersiyonlu 846 sekanslı hedef bölgede bulunan aranan bazların tümü %1,44 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)

- Delesyon uzunlukları ≤ 21 (21 Delesyonlu 846 sekanslı hedef bölgede bulunan bazların tümü %7,86 no-call oranı ile doğru olarak aranmıştır)

Kesinlik

NovaSeq 6000Dx Aleti'nin kesinliği; 9.232 hedef oligo kullanarak 23 farklı kromozomda 1.970.505 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test ile Platinum Genome numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplam 1723 hedefli küçük varyant (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) değerlendirilmiştir. Germ hattı testi, dört benzersiz Platinum Genome örneğinin on bir veya on iki tekrarından oluşmuştur. Somatik testler, farklı VAF seviyelerinde dört benzersiz FFPE ile işlem görmüş Platin Genomu örneğinin on bir veya on iki tekrarından oluşmuştur. Numune kitaplıkları Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri kullanılarak hazırlanmıştır.

Testler, altı başlangıç günü boyunca üç tane NovaSeq 6000Dx Aleti, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)'nin her biri için üç lot ve iki operatör kullanılarak bir dahili çalışma merkezinde gerçekleştirilmiştir. Her başlangıç günü için, germ hattı numune kitaplıkları, S2 reaktifleri ve DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ hattı FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı kullanılarak cihazın bir tarafında sekanslanmış ve somatik numune kitaplıkları, S4 reaktifleri ve DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Somatic FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı kullanılarak cihazın diğer tarafında sekanslanmıştır. Bu test sonucunda germ hattı ve somatik iş akışlarının her biri için 18 akış hücresi elde edilmiştir.

Germ Hattı

Germ hattı çalışmalarında, hedeflenen germ hattı varyantının saptandığı genomik konumlar pozitif (varyant) olarak rapor edilir. Beklenen pozitif germ hattı varyantları için veriler, her bir varyant türündeki (SNV, insersiyon, delesyon) no call oranı ve yüzde pozitif arama (PPC) açısından değerlendirilmiştir. [Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Germ Hattı Arama Gözlemleri sayfa 55](#), her bir varyant türü için Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven seviyeleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranları özetlemektedir.

Tablo 25 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumlu Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PPC	%95 LCL ³	%95 UCL
SNV	6	980316	<0,01	979854	980310	99,95	99,95	99,96
İnsersiyon	0	36738	0	36738	36738	100	>99,99	100
Delesyon	18	34434	0,05	32160	34416	93,44	93,18	93,70

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Pozitif arama, varyantın tespit edildiği hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Hedeflenen bir varyantın saptanmadığı genomik konumlar negatif (yabani tip) olarak rapor edilir. Beklenen negatif konumlar için veriler, no call ve negatif arama yüzdesi (PNC) oranları açısından değerlendirilmiştir. [Beklenen Negatif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Germ Hattı Arama Gözlemleri sayfa 56](#) kısmında, Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 26 Beklenen Negatif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumsuz Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PNC	%95 LCL ³	%95 UCL
Yabani tip	0	406170	0	406170	406170	100	>99,99	100

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Negatif arama, bir varyantın saptanmadığı hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Her parametrenin (cihaz, reaktif lotu, gün, kitaplık kopyası) genel değişkenliğe katkısı, yanıt değişkeni olarak varyant sıklığı kullanılarak varyans bileşen analizi ile belirlenmiştir. Genel standart sapmanın ortalaması 0,0370 idi. Varyant frekansı değişkenliğine en fazla katkıda bulunan şey, genel değişkenliğin %17,1'ine katkıda bulunan kitaplık hazırlık kopyalarından olmuştur. Gün %1'e katkıda bulunurken, cihaz ve reaktif lotlarının her biri, [Germ hattı Numune Varyant Frekansları için Laboratuvar İçi Kesinlik Varyant Bileşenleri Tahminleri sayfa 56](#) dahilinde toplam değişkenliğin %1'inden azına katkıda bulunmuştur (SD = standart sapma).

Tablo 27 Germ hattı Numune Varyant Frekansları için Laboratuvar İçi Kesinlik Varyant Bileşenleri Tahminleri

Bileşen	Ortalama SD	Toplam SD'nin ortalama %'si
Gün	0,0020	1,028
Cihaz	0,0018	0,837
Sarf malzemesi lotu	0,0016	0,712
Kitaplık kopyası	0,0143	17,110
Toplam	0,0370	100

Somatik

Somatik çalışmalar için, hedeflenen bir somatik varyantın saptandığı genomik konumlar pozitif (varyant) olarak rapor edilir. VAF'lerde beklenen pozitif somatik varyantları %6,5 ile %13 arasında olan GM12877-13 ve GM12878-13 numuneleri için veriler, her varyant türünde (SNV, insersiyon, delesyon) arama oranı olmaması ve pozitif arama yüzdesi (PPC) açısından değerlendirilmiştir. [Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri \(VAF \$\geq\$ %6,5 ve \$\leq\$ %13\) sayfa 57](#), her bir varyant türü için Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven seviyeleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranları özetlemektedir.

Tablo 28 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri (VAF \geq %6,5 ve \leq %13)

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumlu Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PPC	%95 LCL ³	%95 UCL
SNV	0	96939	0	96069	96939	99,10	99,04	99,16
İnsersiyon	0	3004	0	3004	3004	100	99,87	100
Delesyon	0	2912	0	2907	2912	99,83	99,60	99,93

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Pozitif arama, varyantın tespit edildiği hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Hedeflenmiş bir somatik varyantın saptanmadığı genomik konumlar negatif (yabani tip) olarak rapor edilir. Beklenen negatif konumlar için veriler, no call ve negatif arama yüzdesi oranları açısından değerlendirilmiştir. [Beklenen Negatif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri sayfa 57](#) kısmında, her varyant türü için Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 29 Beklenen Negatif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumsuz Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PNC	%95 LCL ³	%95 UCL
Yabani tip	0	194922	0	194919	194922	>99,99	>99,99	100

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Negatif arama, bir varyantın saptanmadığı hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Her parametrenin (cihaz, reaktif lotu, gün, kitaplık kopyası) genel değişkenliğe katkısı, yanıt değişkeni olarak varyant sıklığı kullanılarak varyans bileşen analizi ile belirlenmiştir. Genel standart sapmanın ortalaması 0,0062 idi. Kitaplık hazırlık kopyaları, toplamın %50,7'sini oluşturan en önemli değişkenlik kaynağı olarak kalmıştır. Gün, cihaz ve sarf malzemesi lotunun tümü, [Somatik Numune Varyant Frekansları için Laboratuvar İçi Kesinlik Varyans Bileşenleri Tahminleri sayfa 57](#)'nin toplam değişkenliğinin %1'inden azına katkıda bulunmuştur (SD = standart sapma).

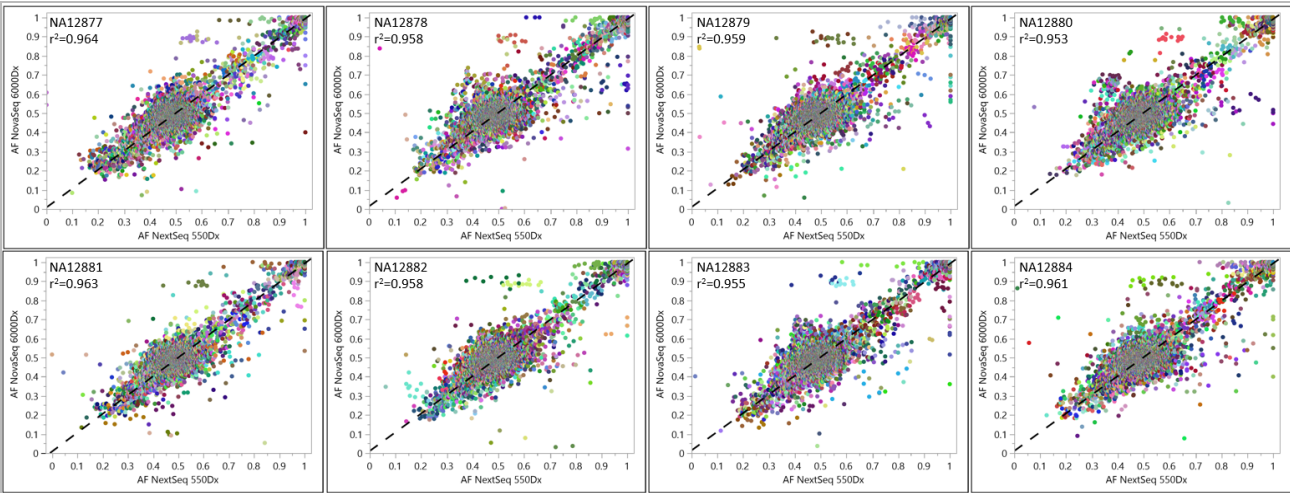
Tablo 30 Somatik Numune Varyant Frekansları için Laboratuvar İçi Kesinlik Varyans Bileşenleri Tahminleri

Bileşen	Ortalama SD	Toplam SD'nin ortalama %'si
Gün	0,0002	0,41
Cihaz	0,0002	0,40
Sarf malzemesi lotu	0,0002	0,35
Kitaplık kopyası	0.0044	50.7
Toplam	0.0062	100

Yöntem Karşılaştırması

NovaSeq 6000Dx ve NextSeq 550Dx Cihazları arasındaki performansı karşılaştırmak için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Kan numuneleri için varyant sıklığı uyumu, 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 baz içeren çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılarak değerlendirilmiştir. Sekiz Platin Genom DNA numunesi, altı kopya halinde yedi tanesi altı tanenin kopyası ve biri (NA12881) beş tanenin kopyası halinde olmak üzere test edilmiştir. Kitaplıklar, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ hattı FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı kullanılarak NovaSeq 6000Dx Aleti üzerinde ve DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager modülü kullanılarak NextSeq 550Dx Cihazında sekanslanmıştır. [Varyant Frekans Korelasyon Çizimleri \(Noktalar benzersiz varyantla renklendirilir. Varyantlar her bir grafikte farklı şekilde renklendirilebilir.\) sayfa 58](#), her bir numune için iki cihaz arasındaki VAF korelasyonunu çizer. NovaSeq 6000Dx Aleti ile NextSeq 550Dx cihazı arasındaki güçlü bağıntıya göre, pre-analitik faktörler (ör. ekstraksiyon yöntemleri veya enterferan maddeler) ile ilgili performans özelliklerinin her iki cihaz için geçerli olduğu belirlenmiştir. Ek ayrıntılar için Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prospektüse bakın.

Şekil 15 Varyant Frekans Korelasyon Çizimleri (Noktalar benzersiz varyantla renklendirilir. Varyantlar her bir grafikte farklı şekilde renklendirilebilir.)



Tekrarlanabilirlik

NovaSeq 6000Dx Aleti'nin tekrarlanabilirliği; 9.232 hedef oligo kullanarak 23 farklı kromozomda 1.970.505 bazı kapsayacak şekilde çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test ile Platinum Genome numuneleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplam 1723 hedefli küçük varyant (SNV'ler, insersiyonlar ve delesyonlar) değerlendirilmiştir. Germ hattı testi on iki benzersiz Platinum numunesinin üç veya dört tekrarından oluşmuştur. Somatik testler, farklı VAF düzeylerinde sekiz benzersiz FFPE ile işlem görmüş Platin Genomu numunesinin beş veya altı kopyasından oluşmuştur. Numune kitaplıkları Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri kullanılarak hazırlanmıştır.

Test, NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü) ve NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif v1.5 Kiti (300 döngü)'nin her birinin bir lotu kullanılarak üç harici tesiste gerçekleştirilmiştir. Her çalışma merkezinde bir tek NovaSeq 6000Dx Aleti kullanılmıştır. Her tesiste testi iki operatör gerçekleştirmiştir. Her operatör, üç tesis genelinde toplam 36 akış hücresi olmak üzere, her bir numune türü için ardışık olmayan üç başlangıç gününde testi gerçekleştirmiştir. Her başlangıç günü için, germ hattı numune kitaplıkları, S2 reaktifleri ve DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germline FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı kullanılarak cihaz tarafında A'da sekanslanmış ve somatik numune kitaplıkları, S4 reaktifleri ve DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Somatic FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı kullanılarak cihaz tarafında B'de sekanslanmıştır. Bu test sonucunda germ hattı ve somatik iş akışlarının her biri için 18 akış hücresi elde edilmiştir.

Germ Hattı

Germ hattı çalışmalarında, hedeflenen germ hattı varyantının saptandığı genomik konumlar pozitif (varyant) olarak rapor edilir. Beklenen pozitif germ hattı varyantları için veriler, her bir varyant türündeki (SNV, insersiyon, delesyon) no call oranı ve yüzde pozitif arama (PPC) açısından değerlendirilmiştir. [Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri sayfa 59](#), her bir varyant türü için Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven seviyeleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranları özetlemektedir.

Tablo 31 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumlu Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PPC	%95 LCL ³	%95 UCL
SNV	0	991026	0	990276	991026	99,92	99,92	99,93
İnsersiyon	0	38358	0	38358	38358	100	99,99	100
Delesyon	0	34758	0	32228	34758	92,72	92,44	92,99

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Pozitif arama, varyantın tespit edildiği hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Hedeflenen bir varyantın saptanmadığı genomik konumlar negatif (yabani tip) olarak rapor edilir. Beklenen negatif konumlar için veriler, no call ve negatif arama yüzdesi (PNC) oranları açısından değerlendirilmiştir. [Beklenen Negatif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri sayfa 59](#) kısmında, Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 32 Beklenen Negatif Sonuçlar için Germ Hattı Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumsuz Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PNC	%95 LCL ³	%95 UCL
Yabani tip	0	393516	0	393516	393516	100	>99,99	100

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Negatif arama, bir varyantın saptanmadığı hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Somatik

Somatik çalışmalar için, hedeflenen bir somatik varyantın saptandığı genomik konumlar pozitif (varyant) olarak rapor edilir. Ortalama varyant alel frekansının (VAF) %14 veya daha büyük ve %28 veya daha küçük olduğu beklenen pozitif somatik varyantlar için, veriler her varyant türünde (SNV, insersiyon, delesyon) hiçbir arama oranı ve yüzde pozitif arama (PPC) açısından değerlendirilmiştir. [Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri \(VAF \$\geq\$ %14 ve \$\leq\$ %28\) sayfa 60](#), her bir varyant türü için Wilson Skoru yöntemi kullanılarak hesaplanan alt ve üst %95 güven seviyeleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranları özetlemektedir.

Tablo 33 Varyant Türüne Göre Beklenen Pozitif Sonuçlar için Laboratuvar İçi Kesinlik Somatik Arama Gözlemleri (VAF \geq %14 ve \leq %28)

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumlu Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PPC	%95 LCL ³	%95 UCL
SNV	0	71028	0	70314	71028	98.99	98.92	99.07
İnsersiyon	0	1962	0	1962	1962	100	99.80	100
Delesyon	0	2142	0	2098	2142	97.95	97.25	98.47

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Pozitif arama, varyantın tespit edildiği hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Hedeflenmiş bir somatik varyantın saptanmadığı genomik konumlar negatif (yabani tip) olarak rapor edilir. Beklenen negatif konumlar için veriler, no call ve negatif arama yüzdesi oranları açısından değerlendirilmiştir. [Beklenen Negatif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri sayfa 60](#) kısmında, her varyant türü için Wilson Skoru yöntemiyle hesaplanan alt ve üst %95 güven düzeyleri (LCL/UCL) ile birlikte gözlemlenen oranlar özetlenmektedir.

Tablo 34 Beklenen Negatif Sonuçlar için Somatik Arama Gözlemleri

Varyant Türü	Hiçbir Arama Gözlemlenmedi ¹	Toplam Arama Sayısı	No Call Yüzdesi	Gözlemlenen Olumsuz Aramalar ²	Toplam Değerlendirilebilir Aramalar	PNC	%95 LCL ³	%95 UCL
Yabani tip	0	92718	0	92714	92718	>99,99	99,99	100

¹ No Call, varyantın belirlenemediği hedeflenen kromozomal pozisyon olarak tanımlanır (düşük kapsam derinliği nedeniyle).

² Negatif arama, bir varyantın saptanmadığı hedeflenen kromozomal pozisyonlar olarak tanımlanır.

³ İki taraflı %95 güven aralıkları Wilson skor yöntemi kullanılarak hesaplanır.

Revizyon Geçmişi

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 200025276 v01	Eylül 2022	Germ hattı arama gözlemleri için güncellenmiş kesinlik verileri.
Belge No 200025276 v00	Ağustos 2022	İlk sürüm.

Patentler ve Ticari Markalar

Bu belge ve içindekiler Illumina, Inc. ve bağlı şirketlerinin ("Illumina") mülkiyetinde olup yalnızca işbu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin kullanımıyla bağlantılı olarak müşterisinin sözleşmeye ilişkin kullanımı içindir. Bu belge ve içindekiler Illumina'nın önceden yazılı izni olmaksızın başka hiçbir amaçla kullanılamaz veya dağıtılamaz ve/veya hiçbir şekilde iletilemez, ifşa edilemez ya da kopyalanamaz. Illumina bu belge ile patenti, ticari markası, telif hakkı veya genel hukuk hakları ya da üçüncü tarafların benzer hakları kapsamında hiçbir lisansı devretmez.

Bu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin uygun ve güvenli bir şekilde kullanılması için nitelikli ve uygun eğitim almış çalışanlar bu belgedeki talimatları tam olarak ve açık bir şekilde uygulamalıdır. Söz konusu ürün/ürünler kullanılmadan önce bu belgedeki tüm bilgiler tam olarak okunmalı ve anlaşılmalıdır.

BU BELGEDE YER ALAN TÜM TALİMATLARIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIK BİR ŞEKİLDE UYGULANMAMASI, ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN HASAR GÖRMESİNE, KULLANICI VEYA BAŞKALARI DAHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA VE DİĞER MALLARIN ZARAR GÖRMESİNE NEDEN OLABİLİR VE ÜRÜN/ÜRÜNLER İÇİN GEÇERLİ OLAN HER TÜRLÜ GARANTİYİ GEÇERSİZ KILACAKTIR.

ILLUMINA BU BELGEDE AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (ÜRÜNÜN PARÇALARI VE YAZILIMI DAHİL) YANLIŞ KULLANIMINDAN DOĞAN DURUMLARDAN SORUMLU TUTULAMAZ.

© 2022 Illumina, Inc. Tüm hakları saklıdır.

Tüm ticari markalar Illumina, Inc. veya ilgili sahiplerinin malıdır. Özel ticari marka bilgileri için bkz. www.illumina.com/company/legal.html.

İletişim Bilgileri



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 ABD

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (Kuzey Amerika dışından)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Hollanda

Avustralya Sponsoru

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Avustralya

Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülebilecek sembollere dair eksiksiz referans için support.illumina.com adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belge) sekmesindeki sembol anahtarına bakın.